

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano  
de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con *steam  
explosion***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ángeles Martínez-Alcalá García

Directores

María Jesús Martínez Hernández  
Miguel Jurado García de Posada

**Madrid, 2012**

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL:**

**MEJORA DEL PROCESO A PARTIR DE  
GRANO DE CEREAL Y DE BIOMASA  
LIGNOCELULÓSICA TRATADA CON  
*STEAM EXPLOSION***

**Ángeles Martínez-Alcalá García**

**TESIS DOCTORAL**

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Farmacia  
Madrid, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID





## **Producción de Bioetanol:**

### **Mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con *steam explosion***

**Tesis doctoral presentada por  
Ángeles Martínez-Alcalá García para optar al título de  
Doctora por la Universidad Complutense de Madrid**

Directores:

M<sup>a</sup> Jesús Martínez Hernández  
Investigador Científico del CSIC  
CIB-CSIC, Madrid

Miguel Jurado García de Posada  
Doctor en Biología UCM

Madrid 2011

Portada: “*Campos de trigo*”, *Vicent van Gogh*.

***“No hay nadie menos afortunado que el hombre a quien la adversidad olvida, pues no tiene oportunidad de ponerse a prueba”***

**Séneca**





***A mis padres y hermanos***  
***A Jaime***





## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo, realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ha sido financiado en el marco de un proyecto PETRI, “Enzimas implicadas en la degradación de cereales, residuos de cereales y otros materiales lignocelulósicos, para su conversión en azúcares fermentables dirigidos a la producción de bioetanol”, (Ref PET2005 0724), y una beca postgrado I3P del CSIC con interés para el sector industrial.

Como todo tiene un orden en la vida, me gustaría agradecer en primer lugar a la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Martínez, directora de esta tesis. Ha sido un camino largo, y ahora que ha llegado a su final, quiero dedicarte especialmente el trabajo realizado. Gracias por toda tu ayuda y dedicación.

Gracias al Dr. Miguel Jurado, codirector de esta tesis, por tu apoyo y explicaciones en la parte de lacasas, y a la Dra. Alicia Prieto cuyo nombre resulta indispensable en este punto, y casi podría decir que es también codirectora de la misma.

A la empresa Abengoa Bioenergía, por su inestimable ayuda y confianza depositada en mi trabajo; gracias a Pablo, Bruno y Elena.

A los Dres. Ángel T. Martínez, Javier Ruiz-Dueñas y Susana Camarero y mis compañeros del CIB, los que siguen ahí y los que ya están desarrollando su actividad profesional en otro sitio, Elvira, David, María, Aitor, Víctor, Davinia, Yuta, M<sup>a</sup> José y Bea; a los que han pasado y han dejado su huella como Giusy, Mario y Rosario. Por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Al Dr. Eduardo Espeso, nunca olvidaré tu corrección del DEA y las charlas tan divertidas, mil gracias.

A los amigos que he conocido en estos años en el mundo de la investigación. Ana Cañas, muchas gracias por tu apoyo, a Marta y Patricia, por las risas, y a ti Mariela, qué decirte, solo darte las gracias por ser como eres...

A Javier, Pedro y Juan Ignacio, por esas comidas, por esas risas, por estar ahí.

A Mariano y Mercedes, que ya forman parte de mi vida; gracias por los consejos y tantos buenos ratos, que están solo empezando.

A mis amigas de toda la vida, aquellas con las comparto tantos buenos momentos y confidencias...GRACIAS.

No puedo terminar estos agradecimientos sin nombrar a mi gran familia, grande en todos los sentidos de la palabra. A mis padres, por los valores que me han transmitido, por la lucha incansable en busca de la meta trazada, por esa educación que roza la perfección y sobre todo por la generosidad, abrumadora y desinteresada, que hacen a mis hermanos y a mí poner el listón cada vez más alto en la vida.

A mis hermanos, no os digo nada que luego ya sé lo que me toca...

A ti Jaime, cuando empecé este proyecto en Madrid, nunca pensé que llegaría a dar con la persona con la que voy a compartir el resto de mi vida, por tu cariño, tu alegría, tu generosidad y por todos esos sueños que tenemos juntos.

Y por último, a aquellas personas tan queridas, que seguro que desde el cielo están celebrando este momento.

A TODOS GRACIAS

## ÍNDICE

### Resumen

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	3
1.2. BIOCOMBUSTIBLES EN EL SECTOR DEL TRANSPORTE.....	4
1.3. BIOETANOL.....	6
1.3.1. BIOETANOL EN CIFRAS.....	6
1.3.2. APLICACIONES DEL BIOETANOL COMO CARBURANTE.....	9
1.3.2.1. ETBE.....	9
1.3.2.2. Gasolinas oxigenadas.....	10
1.3.2.3. Mezclas de alto contenido en etanol.....	10
1.3.2.4. E-Diésel.....	11
1.4. LA BIOMASA COMO FUENTE DE OBTENCIÓN DE ETANOL.....	11
1.5. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE PRIMERA GENERACIÓN...	13
1.5.1. ETANOL A PARTIR DE GRANO DE CEREALES.....	14
1.5.1.1 Estructura de los granos de trigo y cebada.....	14
1.5.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA.....	16
1.5.2.1 Recepción y Procesamiento de los granos.....	16
1.5.2.2 Almacenamiento de los granos.....	17
1.5.2.3 Molienda.....	18
1.5.3 ETAPAS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.....	20
1.5.3.1 Etapa de Mezcla.....	20
1.5.3.2 Etapa de Licuefacción.....	21
1.5.3.3 Etapas de Sacarificación y Fermentación.....	22
1.5.3.4 Proceso de Destilación.....	26
1.6 PRODUCCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	28
1.6.1 COMPOSICIÓN DE LA LIGNOCELULOSA.....	30
1.6.1.1 Celulosa.....	31
1.6.1.2 Hemicelulosa.....	31
1.6.1.3 Lignina.....	32

1.6.2 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE PAJA DE CEREALES.....	35
1.6.2.1 Pretratamiento: Steam explosion.....	36
1.6.2.2 Hidrólisis enzimática.....	37
1.6.2.3 Fermentación de los azúcares a etanol.....	38
1.7 LACASAS FÚNGICAS.....	39
1.7.1 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS LACASAS.....	40
1.7.2 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS LACASAS Y SISTEMAS LACASAS-MEDIADOR.....	41
1.8 OBJETIVOS.....	47
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
2.1 MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS.....	51
2.1.1 GRANOS DE TRIGO Y CEBADA.....	51
2.1.2 SLURRY DE PAJA DE TRIGO.....	52
2.2 MICROORGANISMOS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	53
2.2.1 <i>Coriolopsis rigida</i> .....	53
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	54
2.3 ENZIMAS Y CÓCTELES ENZIMÁTICOS.....	55
2.3.1 CÓCTELES COMERCIALES.....	55
2.3.2 LACASAS FÚNGICAS.....	56
2.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	56
2.4.1 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS.....	57
2.4.2 VALORACIÓN DE SUSTANCIAS REDUCTORAS.....	57
2.4.3 VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	58
2.4.3.1 Lacasa.....	59
2.4.3.2 Peroxidasa.....	59
2.4.3.3 Proteasa.....	59
2.4.3.4 Actividades implicadas en la degradación de almidón.....	60
2.4.3.5 Actividades implicadas en la degradación de hemicelulosas....	61
2.4.3.6 Actividades implicadas en la degradación de celulosa.....	62
2.4.3.7 Actividad sobre $\beta$ -(1,3)-glucanos de la pared celular vegetal....	64
2.4.4 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE COMPLEJOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES.....	64

2.5 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE TRIGO Y CEBADA.....	66
2.5.1 FRACCIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA.....	66
2.5.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	67
2.5.3 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	68
2.5.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	68
2.5.5 DETERMINACIÓN DE LIGNINA KLASON.....	69
2.5.6 ANÁLISIS DE AZÚCARES.....	69
2.5.7 TIPOS DE ENLACE EN LOS POLISACÁRIDOS.....	71
2.5.8 ANÁLISIS DE ÁCIDOS URÓNICOS.....	72
2.6 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE HARINA DE TRIGO.....	74
2.6.1 ETAPA DE MEZCLA.....	76
2.6.2 ETAPA DE LICUEFACCIÓN.....	76
2.6.3 ETAPAS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN.....	78
2.6.3.1 Etapa de Sacarificación.....	78
2.6.3.1 Etapa de Fermentación.....	78
2.7 TRATAMIENTO DE <i>SLURRY</i> DE PAJA DE TRIGO CON LACASA.....	79
2.7.1 TRATAMIENTOS CON LACASAS FÚNGICAS.....	79
2.7.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA BIOMASA Y FERMENTACIÓN DEL HIDROLIZADO.....	80
2.7.2.1 Tratamiento con lacasa del <i>slurry</i> .....	80
2.7.2.2 Efecto del tratamiento del <i>slurry</i> con la lacasa sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> y la producción de etanol.....	81
2.7.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO.....	82
2.7.4 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	82
2.7.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	83
2.7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	83
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
3.1 ESTUDIO DE COMPLEJOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES.....	87
3.1.1 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ENCONTRADAS EN LOS COMPLEJOS COMERCIALES ESTUDIADOS.....	89

3.1.1.1	Actividad proteasa.....	89
3.1.1.2	Actividades amiláceas.....	90
3.1.1.3	Actividades xilanolíticas.....	91
3.1.1.4	Actividades celulolíticas.....	93
3.1.1.5	Actividad $\beta$ -(1,3)-glucanasa.....	95
3.1.1.6	Resumen de actividades.....	95
3.1.2	CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS.....	97
3.1.2.1	pH óptimo de los complejos enzimáticos.....	97
3.1.2.2	Estabilidad al pH de los complejos enzimáticos.....	103
3.1.2.3	Estudios de la actividad frente a la temperatura.....	112
3.1.2.4	Estabilidad a la temperatura de los complejos enzimáticos...	119
3.2	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE TRIGO Y CEBADA.....	129
3.2.1	PESO SECO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LAS HARINAS.....	131
3.2.2	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE LAS DIFERENTES FRACCIONES.....	131
3.2.3	CONTENIDO EN PROTEÍNAS DE LAS HARINAS.....	133
3.2.4	CONTENIDO EN LIGNINA DE LAS HARINAS.....	134
3.2.5	CONTENIDO EN AZÚCARES DE LAS HARINAS.....	134
3.2.6	CONTENIDO EN ÁCIDOS URÓNICOS DE LAS HARINAS.....	136
3.2.7	ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS POLISACÁRIDOS DE LAS FRACCIONES DE HARINA DE CEREAL.....	136
3.3	OPTIMIZACIÓN DE LAS DOSIS DE ENZIMAS NECESARIAS PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE GRANO DE TRIGO.....	139
3.3.1	ETAPA DE MEZCLA.....	141
3.3.2	ETAPA DE LICUEFACCIÓN.....	143
3.3.3	ETAPA DE SACARIFICACIÓN.....	153
3.3.4	ETAPA DE FERMENTACIÓN.....	155

3.4 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE PAJA DE TRIGO: APLICACIÓN DE LACASAS FÚNGICAS EN EL PROCESO.....	159
3.4.1 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES PARA EL TRATAMIENTO DEL <i>SLURRY</i> CON LACASAS.....	162
3.4.2 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE <i>SLURRY</i> DE PAJA DE TRIGO.....	164
<b>4 DISCUSIÓN.....</b>	<b>172</b>
4.1 ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES.....	173
4.1.1 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ENCONTRADAS EN LOS COMPLEJOS COMERCIALES ESTUDIADOS.....	176
4.1.2 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS..	180
4.2 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE TRIGO Y CEBADA.....	183
4.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS DOSIS DE ENZIMAS NECESARIAS PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE GRANO DE TRIGO.....	189
4.4 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE PAJA DE TRIGO: APLICACIÓN DE LACASAS FÚNGICAS EN EL PROCESO.....	195
4.4.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LACASAS EN LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	197
4.4.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LACASAS EN EL CONTENIDO EN AZÚCARES LIBRES Y LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	199
4.4.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LACASAS EN EL CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS Y LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.....	200
4.5 PERSPECTIVAS FUTURAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL 2G.....	203
4.5.1 TENDENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL 2G.....	205
4.5.2 POSIBLES MODELOS DE INTEGRACIÓN DE LAS DISTINTAS ETAPAS DE PROCESO.....	208
4.6 CONCLUSIONES.....	213
<b>5 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>216</b>





## ABREVIATURAS I

<b>ABNT</b>	<i>Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías</i>
<b>ABTS</b>	<i>Ácido [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)]</i>
<b>BSTFA</b>	<i>Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida</i>
<b>CBP</b>	<i>Bioproceso Integrado o Consolidado "Consolidated Bioprocessing"</i>
<b>CFB</b>	<i>Tampón Citrato-Fosfato-Borato</i>
<b>CIEMAT</b>	<i>Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas</i>
<b>CMC</b>	<i>Carboximetilcelulosa</i>
<b>DDGS</b>	<i>Granos de Destilación o Ecoproteína "Dried Distiller's Grains and Solubles"</i>
<b>DMP</b>	<i>2,6-dimetoxifenol</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimetilsulfóxido</i>
<b>eBIO</b>	<i>"European Bioethanol Fuel Association"</i>
<b>EC</b>	<i>Equivalentes de catecol</i>
<b>FFVs</b>	<i>Vehículos con carburante flexible "Flexible Fuel Vehicles"</i>
<b>FPU</b>	<i>Unidades determinadas sobre Papel de Filtro</i>
<b>GC</b>	<i>Cromatografía de gases "Gas Chromatography"</i>
<b>GC-MS</b>	<i>Cromatografía de gases-Espectrometría de masas "Gas Chromatography / Mass Spectrometry"</i>
<b>HBT</b>	<i>1-hidroxibenzotriazol</i>
<b>HE</b>	<i>Hidrólisis enzimática</i>
<b>IR</b>	<i>Infrarrojo</i>
<b>IU</b>	<i>Unidades internacionales</i>
<b>KBr</b>	<i>Bromuro Potásico</i>
<b>NREL</b>	<i>"National Renewable Energy Laboratory"</i>
<b>OPEP</b>	<i>Organización de Países Árabes Exportadores de Petróleo</i>
<b>pI</b>	<i>Punto Isoeléctrico</i>
<b>pNP</b>	<i>p-nitrofenol</i>
<b>pNPX</b>	<i>p-nitrofenil-β-D-xilopiranósido</i>
<b>SR</b>	<i>Sustancias Reductoras</i>
<b>SSCF</b>	<i>Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea "Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation"</i>
<b>SSF</b>	<i>Sacarificación y Fermentación Simultánea "Simultaneous Saccharification and Fermentation"</i>



## ABREVIATURAS II

<b>TEP</b>	<i>Tetraetilo de plomo</i>
<b>TFA</b>	<i>Ácido trifluoroacético</i>
<b>Tm</b>	<i>Millones de Toneladas</i>
<b>UE</b>	<i>Unión Europea</i>
<b>UFC</b>	<i>Unidades formadoras de colonias</i>
<b>1G</b>	<i>Etanol de Primera Generación</i>
<b>2G</b>	<i>Etanol de Segunda Generación</i>
<b><math>\alpha</math>-pNPG</b>	<i>p-nitrofenil-<math>\alpha</math>-D-glucopiranosido</i>
<b><math>\beta</math>-pNPG</b>	<i>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-glucopiranosido</i>
$\lambda$	<i>Longitud de onda</i>
$\epsilon$	<i>Coeficiente de extinción molar</i>



## RESUMEN

El incremento de la población mundial y el gran desarrollo industrial han contribuido fuertemente a disminuir las reservas de petróleo del planeta y aumentar la contaminación ambiental. Por esta razón se ha impulsado la búsqueda de energías renovables alternativas que permitan asegurar el abastecimiento de combustible y a su vez ser más respetuosas con el medioambiente. El bioetanol, con prestaciones similares a la gasolina, se obtiene como producto de fermentación de materias vegetales y puede ser una gran esperanza como combustible para sector del transporte.

En la actualidad, el bioetanol que se comercializa se produce a partir de la fermentación de los azúcares de la caña de azúcar, la remolacha o las semillas de cereales (etanol de primera generación o 1G). Sin embargo, para evitar utilizar que la producción de este alcohol interfiera con la cadena alimentaria, se está potenciando el estudio del etanol de segunda generación (2G), producido a partir de biomasa lignocelulósica.

En este trabajo se han abordado diferentes aspectos de los procesos de producción del bioetanol 1G y 2G, utilizando grano y paja de trigo, respectivamente, con el fin de optimizar y/o mejorar estos procesos.

Tras el estudio y caracterización de las actividades enzimáticas presentes en 15 complejos comerciales, se seleccionaron los más idóneos para tratar de optimizar la producción de etanol 1G. Los estudios, a escala de laboratorio, ponen de manifiesto que existen cócteles pocos conocidos, con alta actividad específica, que pueden ser una alternativa eficaz para mejorar la producción de este alcohol.

Por otra parte, los pretratamientos que se utilizan para desestructurar el material lignocelulósico y permitir el acceso de las enzimas a los polisacáridos de la pared celular vegetal, generan inhibidores que afectan negativamente el proceso. En este trabajo se ha comprobado que las lacasas, oxido-reductasas fúngicas implicadas en la degradación de la lignina, pueden jugar un papel importante en la optimización de la producción de etanol 2G, ya que se ha comprobado que estas enzimas detoxifican la paja de trigo pretratada por *steam explosion* (en presencia de vapor de agua o ácido diluido), permitiendo un mayor crecimiento de las levaduras e incrementando entre 2 y 3 veces la producción de etanol.



# **1. INTRODUCCIÓN**





## 1.1 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

En las últimas décadas, los avances industriales y los cambios en nuestro estilo de vida han afectado profundamente al sector de la energía, modificando de manera considerable el panorama energético. El incremento de la demanda de energía, el notable aumento de los precios del petróleo, la inseguridad del abastecimiento energético y el temor al calentamiento del planeta nos han llevado a darnos cuenta que la energía ya no puede considerarse un bien garantizado. Con el fin de paliar los problemas derivados de la reducción de las fuentes de energía tradicional, la mayoría derivadas de los combustibles fósiles, los gobiernos de los países desarrollados se han comprometido a aumentar el uso de las energías renovables, diversificando su origen. Para conseguir estos objetivos se está impulsando fuertemente la inversión en estas energías, que pueden contribuir a un desarrollo más sostenible, reduciendo las emisiones de CO<sub>2</sub> y el calentamiento global, y así tratar de garantizar el abastecimiento energético de todo el planeta.

Sin embargo, el fomento y la utilización de las energías renovables necesitan un marco legislativo global que proporcione a las empresas la estabilidad necesaria para tomar decisiones razonables en cuanto a las inversiones en este sector. Así, en los últimos años, se ha desarrollado una política estratégica conjunta en la Unión Europea (UE). Cabe destacar la directiva de julio de 2009 (2009/28/CE), que establece un marco común de uso de energías renovables con el fin de garantizar un futuro con una energía más limpia, más segura y más competitiva. En este documento la UE establece que, para el año 2020, el 20% del consumo final de energía del conjunto de los Estados debe proceder de fuentes de carácter renovable. Para conseguirlo, cada Estado podrá escoger “el *mix*” de energías renovables que considere más adecuado (biocombustibles, energía solar, energía eólica...) e intercambiar con otros Estados los diferentes tipos de energía. Al menos un 10% de este consumo renovable de energía afecta al sector transporte, por lo que los biocombustibles aparecen como un elemento esencial para lograr los retos propuestos y muchos países están potenciando las investigaciones en este sector.

Estos objetivos, sumamente ambiciosos (puesto que actualmente solo el 8,5% de la energía procede de fuentes renovables), han obligado a todos los Estados a revisar los planes y objetivos inicialmente propuestos, ya que se requerirán esfuerzos considerables de los distintos sectores económicos para conseguirlos.

## **1.2 BIOCOMBUSTIBLES EN EL SECTOR DEL TRANSPORTE**

El término biocombustible engloba a todos aquellos combustibles derivados de la biomasa vegetal que pueden proporcionar una fuente de energía renovable y limpia, pudiendo ser líquidos, gaseosos o sólidos. En general los biocombustibles sólidos se utilizan para la generación de energía térmica y no para el transporte, siendo los combustibles líquidos y gaseosos, conocidos como biocarburantes, los dedicados para este fin. Estos deben presentar características similares a los productos de origen fósil y, aunque de momento no pueden sustituirlos totalmente, sí que pueden ser incluidos en mezclas de estos. De esta forma, podrían ayudar a reducir nuestra dependencia del petróleo y contribuir sensiblemente a la reducción de los gases de efecto invernadero, de acuerdo con lo establecido en el Protocolo de Kyoto. Cabe destacar que la quema de combustibles fósiles por el hombre, para generar calor o energía, representa la mayor fuente de emisiones de CO<sub>2</sub> y que más del 30% de estas emisiones corresponde al consumo de combustibles líquidos en los países industrializados (Gómez et al., 2008).

La principal ventaja de los biocombustibles es que no contribuyen a aumentar la cantidad de CO<sub>2</sub> emitido a la atmósfera, ya que los mismos se reciclan y no se extraen de fuentes de carbono secuestradas de la atmósfera hace miles de años, como son los yacimientos fósiles. Sin embargo, para que los biocombustibles sean una alternativa energética real se necesita que estos productos no solo presenten características equivalentes a los de procedencia fósil, sino que el balance energético a lo largo de su cadena productiva sea positivo y que su coste, una vez tenidos en cuenta los requerimientos sociales y ambientales, resulte

favorable o al menos sea similar al de los combustibles fósiles (Fatih Demirbas, 2009).

Entre los biocombustibles se encuentran los biocarburantes, entre los que destacan principalmente el biodiésel y el bioetanol, dos productos que utilizan vegetales como materia prima pero cuyo éxito no depende de la disponibilidad de esta, sino de la existencia de una demanda suficiente ya que el desarrollo de su mercado podría aprovecharse para potenciar otras políticas agrícolas (García Camús y García Laborda, 2006).

- ♣ Biodiésel: combustible líquido similar al gasóleo, producido solo para su uso como biocarburante, que se obtiene por transesterificación de aceites vegetales (de girasol, colza, soja o palma), aceites usados (aceites de fritura) o grasas animales con alcoholes ligeros (metanol, etanol), dando lugar a un residuo de glicerina, que puede ser usado por otras industrias, como la cosmética (Janaun y Ellis, 2010). Tanto en España como a nivel internacional, se puede decir que la producción tiende a provenir mayoritariamente de los aceites extraídos de plantas oleaginosas, especialmente girasol (en España e Italia) y colza (en países de Centro Europa). En la actualidad, el aumento en la producción del mismo, ha contribuido a crear comisiones específicas que valoren la situación del sector y propongan distintas actuaciones que incluyan la adaptación a las normativas vigentes y propuestas de actividades de investigación que ayuden al desarrollo de este biocombustible.
  
- ♣ Bioetanol: combustible líquido con prestaciones similares a la gasolina, que se obtiene como producto de fermentación de materias vegetales ricas en azúcares o almidón, cuyo interés se va a desarrollar en los apartados siguientes.

## **1.3 BIOETANOL**

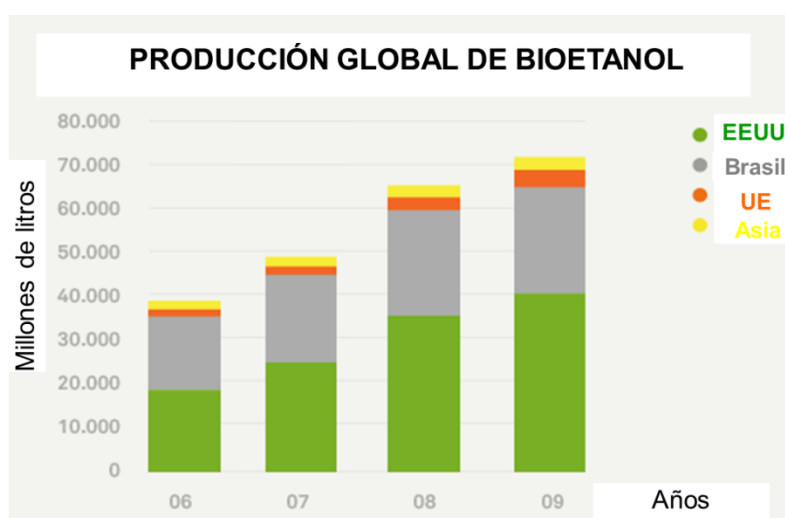
La utilización del etanol como carburante para automoción, comienza en los orígenes del transporte motorizado (Fatih Demirbas, 2009). Samuel Morrey fue el primero en utilizar una mezcla de etanol/trementina en motores de combustión interna en 1820 en Norte América. También en el siglo XIX, el ingeniero alemán Nicholas Otto desarrolló el primer motor de combustión interno que funcionaba con etanol y Henry Ford fabricó el primer automóvil que funcionaba con etanol. Años después, en 1908, también fue Henry Ford el que fabricó un nuevo modelo (Modelo T) que podía funcionar tanto con alcohol como con gasolina o una mezcla de los dos (Solomon et al., 2007). A partir de 1920 el uso del aceite fósil, ligeramente refinado, resultó generar más energía por litro que los combustibles vegetales, siendo además más económico y el petróleo no tardó en dejar atrás a los combustibles vegetales. Sin embargo, como consecuencia de la crisis del petróleo, desencadenada por la Organización de Países Árabes Exportadores de Petróleo (OPEP) en 1973, en la que se limitó la producción de petróleo y aumentó el precio de este, surgió de nuevo la posibilidad de utilizar combustibles alternativos. Brasil inició un programa en 1975, denominado PROALCOOL, cuya finalidad era reducir su dependencia de los recursos fósiles, aumentando la producción de alcohol producido a partir de caña de azúcar. Poco después EEUU comenzó también a desarrollar programas para producir etanol, fundamentalmente a partir de maíz, y hoy en día son los dos países que más producen y exportan este alcohol. A partir del año 2000 la producción bioetanol tuvo una gran expansión en el resto del mundo, cuando Europa y otros países se unieron a la búsqueda de combustibles alternativos, al darse cuenta del agotamiento de los recursos fósiles y el problema ambiental generado por las emisiones de CO<sub>2</sub> durante su combustión.

### **1.3.1 BIOETANOL EN CIFRAS**

La producción de este biocombustible varía dependiendo de las materias primas disponibles y de las políticas agrarias existentes en cada estado. Para mejorar la competitividad del bioetanol frente a los combustibles

derivados del petróleo se deben reducir los costes de su producción. Para ello, se necesita reducir el precio de las materias primas, ya que estas suponen alrededor del 60% de su precio final. Para conseguir esto, es necesario desarrollar nuevos cultivos y considerar la biomasa secundaria y los residuos orgánicos como recursos complementarios, siendo en este momento la biomasa lignocelulósica la opción más prometedora para producir bioetanol.

El sector del bioetanol en la Unión Europea es en comparación a los Estados Unidos y Brasil mucho menor. En la **Figura 1.1** se muestra la producción global de etanol durante los últimos años. Durante el año 2009 destacó la producción de bioetanol procedente de maíz en EEUU (37 millones de litros) y de caña de azúcar en Brasil (28 millones de litros). Con los nuevos proyectos aprobados en ese año en América, Asia y la UE, la producción global de bioetanol podría alcanzar los 125 billones de litros en el año 2020 (Balat y Balat, 2009).

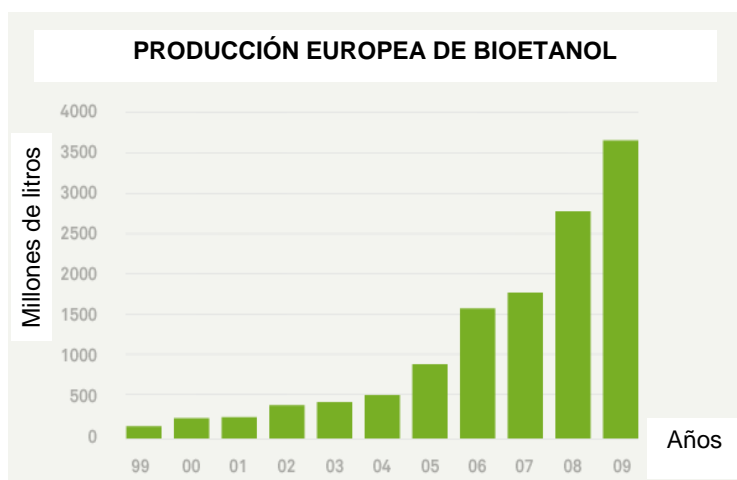


**Fig. 1.1.** Comparativa de la producción de bioetanol en EEUU, Brasil, UE y Asia durante los últimos años (Fuente: Agencia Internacional de Energía, *World Energy Outlook 2010*; <http://www.iea.org>).

En Europa el desarrollo inicial de la producción de etanol como biocombustible fue lento. Tuvieron que pasar 10 años para conseguir aumentar la producción de los 63 millones de litros en 1993 a los 525 millones de litros en 2004. En los siguientes dos años (2005-2006), la producción aumentó más del 70%.

Este crecimiento fue más moderado en 2007 (13% más que en 2006) y aumentó un 56% en 2008, de 1,8 billones en 2007 a 2,8 billones de

litros. En el año 2009 la producción de bioetanol aumentó un 32% respecto al año anterior, llegando a los 3,7 billones de litros (**Fig.1.2**).



**Fig. 1.2.** Desarrollo de la producción de bioetanol en Europa durante los últimos años (Fuente: Ebio; <http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/eu-bioethanol.php>).

Actualmente existen en la UE varios países productores de bioetanol, destacando Francia, Alemania, Holanda y España con más de dos tercios de la producción total.

En España destaca como líder en la producción de bioetanol, la empresa sevillana Abengoa, que ha creado la sociedad Abengoa Bioenergía para operar y desarrollar la actividad de negocio de biocarburantes a escala internacional. A nivel nacional actualmente cuenta con tres plantas de producción: Ecocarburantes Españoles, en Cartagena (Murcia), Bioetanol Galicia en Teixeiro (La Coruña), y Biocarburantes Castilla y León en Babilafuente (Salamanca) que tienen una capacidad total instalada de 150, 176 y 200 millones de litros anuales, respectivamente. Además, esta compañía ha instalado en Francia su cuarta planta en Europa (Abengoa Bioenergy France), en la Plataforma Petrolífera de Lacq (Pyrénées Atlantiques) y la quinta, en Róterdam (Holanda), empezó a funcionar a principios de verano de 2010. Esta última es la planta de bioetanol más grande instalada en Europa y una de las más grandes del mundo y utiliza, principalmente, maíz como materia prima, 1,2 millones de toneladas de grano anuales, para producir 480 millones de litros de etanol y 360.000 toneladas de DDGS (*Dried Distillers Grains with Solubles*), coproducto del proceso que se utiliza para alimentación animal.

Abengoa Bioenergía es también uno de los mayores productores de bioetanol de Estados Unidos. En la actualidad en este país produce más de 752 millones de litros en cuatro plantas en producción (York, Colwich, Portales y Ravenna) y tiene dos plantas más en proceso de construcción una en Indiana y otra en Illinois. Cuando se combinen con el resto de plantas que están en funcionamiento en Europa, la capacidad de producción mundial de este combustible excederá los 3000 millones de litros anuales (<http://www.abengoabioenergy.com>).

### **1.3.2 APLICACIONES DEL BIOETANOL COMO CARBURANTE**

El etanol puede emplearse como combustible único, mezclado con gasolina en distintas proporciones o como aditivo de la misma. En todos los casos da lugar a un biocombustible de alto poder energético, con características muy similares a la gasolina pero con una importante reducción de emisiones contaminantes. En la UE las especificaciones para la utilización de bioetanol se encuentran en la norma Europea de Gasolinas EN 228. En España está recogida en la Directiva 2003/17/CE, relativa a la calidad de las gasolinas y gasóleo, y en el Real Decreto RD. 61/2006.

A continuación se detalla los diferentes biocombustibles alternativos, derivados del etanol, que pueden utilizarse en la actualidad:

#### **1.3.2.1 ETBE (Etil Ter-Butil Éter)**

No se comercializa como un biocombustible, sino como aditivo de la gasolina. El ETBE se obtiene por síntesis química, con bioetanol e isobutileno. Este compuesto apareció como alternativa al MTBE (Metil Ter-Butil Éter), otro aditivo de la gasolina derivado del petróleo que se usa para aumentar el octanaje de la gasolina y que sustituyó al tetraetilo de plomo (TEP), compuesto altamente contaminante (**Fig. 1.3**).



ETBE = 45% Etanol + 55% Isobutileno

MTBE = 36% Metanol + 64% Isobutileno

**Fig. 1.3.** Aditivos en gasolinas.

La gasolina necesita de estos aditivos para aumentar su octanaje y así disminuir su capacidad autodetonante, incrementando su resistencia a la compresión. Aunque el ETBE es algo más caro que el MTBE, es menos tóxico, tiene un índice de octano y un poder calorífico ligeramente superior y produce mejor oxidación de los hidrocarburos aromáticos de la gasolina con la consiguiente reducción en emisiones de CO y compuestos aromáticos (Gómez et al., 2008). Además, el ETBE se puede producir en las mismas instalaciones en las que ahora se obtiene el MTBE. En los países de la UE se acepta su incorporación como oxigenante de las gasolinas, alrededor del 10%, sin que su contenido deba declararse como una característica especial para su venta. Su empleo está totalmente aceptado por los fabricantes de automóviles.

### 1.3.2.2 Gasolinas oxigenadas

Son mezclas de gasolinas con un 5%, 10% o 15% de bioetanol (denominadas E5, E10 y E15, respectivamente). Estas son mezclas habituales autorizadas por la regulación europea y pueden utilizarse sin necesidad de modificaciones en los motores ni aviso previo a los usuarios. Al mezclar etanol y gasolina se evita tener que añadir ETBE para solucionar el problema del bajo octanaje.

### 1.3.2.3 Mezclas de alto contenido en etanol



**Fig. 1.4.** Surtidor de bioetanol

En estos casos son necesarios vehículos adaptados para usar estos biocombustibles. En países como EEUU y Brasil ya existen vehículos llamados vehículos de carburante flexible o *FFVs* (*Flexible Fuel Vehicles*), totalmente polivalentes, que pueden utilizar tanto gasolina convencional como gasolinas con bioetanol en altos porcentajes.

La variedad de mezclas usadas en la actualidad varían entre el 85% (**E85**), 95% (**E95**) y hasta el 100% (**E100**). En la **Figura 1.4** se muestra un surtidor de alcohol tipo.

Debido al respaldo de los gobiernos e instituciones hacia el desarrollo de las energías renovables aplicadas en el sector de la automoción, cada vez son más los fabricantes que investigan y desarrollan vehículos de este tipo.

#### **1.3.2.4 E-Diésel**

El bioetanol también puede utilizarse como aditivo para gasóleo, produciendo un biocombustible diésel con muy buenas características ya que facilita la combustión y contribuye a reducir la contaminación ambiental, ofreciendo así otras alternativas al bioetanol en el campo de los vehículos diésel. El E-Diésel ya se comercializa con éxito en mezclas E3 y E15 para vehículos pesados en EEUU y Brasil, consiguiendo reducciones de hasta el 30% en emisiones de partículas, más del 20% en emisiones de CO y hasta un 5% menos de emisiones NOx (Rakopoulos et al., 2008).

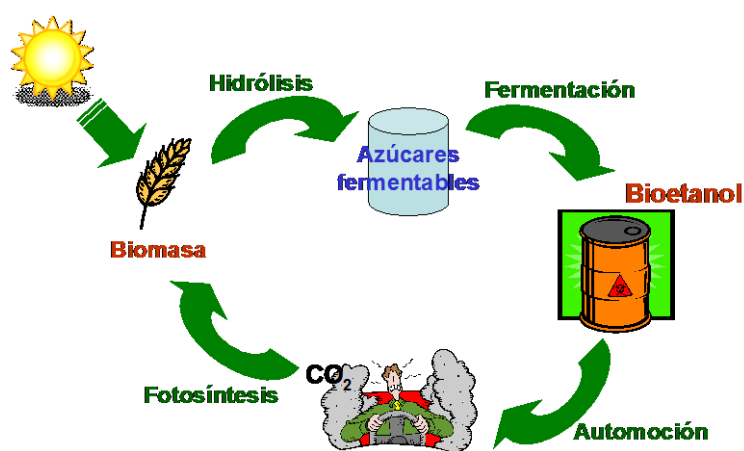
## **1.4 LA BIOMASA COMO FUENTE DE OBTENCIÓN DE ETANOL**

El etanol puede ser obtenido sintéticamente a partir del petróleo, o por conversión de materiales derivados de la biomasa, a través de la fermentación de sus azúcares. Hoy en día, alrededor del 93% del etanol es producido a través de la fermentación de biomasa, y un 7% por métodos sintéticos (Rhodes y Fletcher, 1996).

El término *biomasa*, tal y como se define en la Real Academia Española, “*comprende la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía*”. La formación de biomasa vegetal está basada en el proceso de fotosíntesis de los vegetales y algas, que a partir de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico y de una fuente energética de irradiación (luz), son capaces de realizar un proceso de síntesis que da lugar a moléculas orgánicas con alto contenido en energía química. La producción de

biomasa a escala global en el planeta es muy alta, estimándose que la fotosíntesis fija anualmente 220 mil millones de toneladas de peso seco de biomasa y esta podría utilizarse tanto para alimentación como para contribuir a paliar el déficit de la demanda energética mundial.

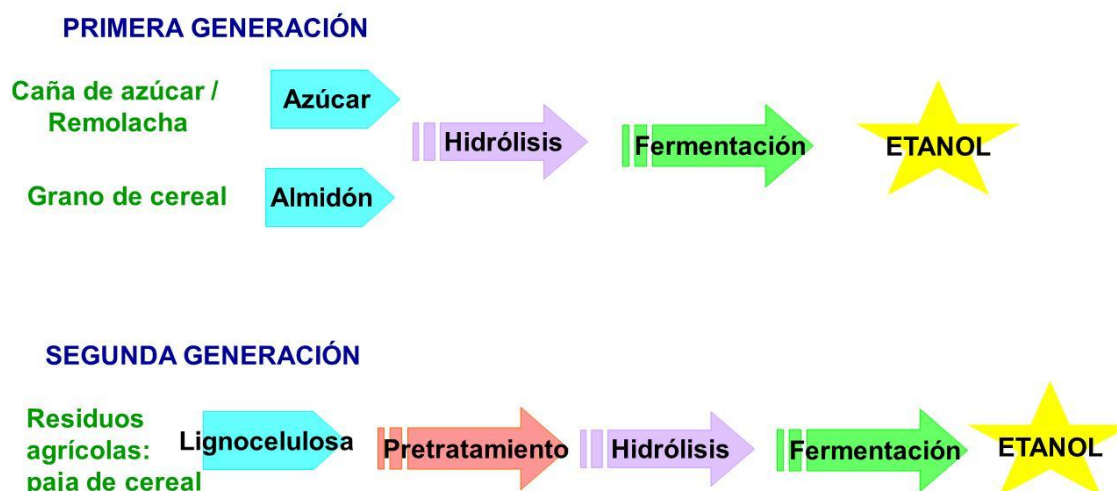
El origen de la biomasa es muy heterogéneo pero en todos los casos para obtener etanol son esenciales tres etapas básicas: 1) la obtención de una solución de azúcares, 2) la fermentación de estos a etanol, y 3) la separación y purificación del etanol, generalmente por destilación y posterior deshidratación (**Fig. 1.5**).



**Fig. 1.5.** Ciclo de la producción de bioetanol a partir de biomasa.

El bioetanol comercializado procede mayoritariamente de la fermentación de los azúcares de la caña de azúcar o remolacha o granos de cereales. El etanol obtenido de estos cultivos se denomina etanol de primera generación (1G). Sin embargo, dado que esas materias primas también se utilizan para alimentación humana y animal, y su disponibilidad es insuficiente para cubrir las demandas programadas por los países industrializados, se está tratando de desarrollar tecnologías alternativas a partir de biomasa lignocelulósica (Sun y Cheng, 2002). Los combustibles así obtenidos, denominados combustibles de segunda generación (2G), podrían llegar a alcanzar niveles de producción hasta 16 veces superiores a los actualmente alcanzados a partir de almidón (Kim y Dale, 2004).

La **Figura 1.6** muestra un esquema de los procesos requeridos para producir etanol 1G y 2G.



**Fig. 1.6.** Esquema general de la obtención del etanol de primera (1G) y segunda (2G) generación a partir de diferentes materias primas.

## 1.5 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE PRIMERA GENERACIÓN

El cultivo más utilizado para la producción de etanol 1G es la caña de azúcar, bien en forma de melaza o de zumo de caña (Sánchez y Cardona, 2008). Esto ocurre principalmente en Brasil aunque también India produce etanol de estos cultivos. El organismo más utilizado para realizar el proceso de fermentación de los azúcares es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que puede fermentar la sacarosa de la caña hasta etanol, controlando las condiciones de aireación (Sánchez y Cardona, 2008; Cardona et al., 2010).

Sin embargo, en EEUU y en Europa el etanol se produce mayoritariamente a partir de la fermentación del almidón presente en los granos de diferentes cereales, dado que en estos países no se cultiva caña de azúcar. En este caso el almidón de los cereales, fundamentalmente maíz en EEUU y grano de cereal en la UE (trigo y maíz en Francia, trigo y cebada en España, y trigo en Alemania y Holanda, según datos de *eBIO*), tiene que ser hidrolizado por amilasas hasta conseguir los azúcares libres (glucosa) que puedan ser fermentados por las levaduras. Cabe destacar que las empresas dedicadas a este sector tienen gran interés por el uso de estas materias primas, tanto por su rendimiento en alcohol como por la obtención de

DDGS, producto proteico muy valorado en el sector de la alimentación animal (apartado 1.5.3.4). A continuación se detalla el proceso de producción de etanol a partir de grano de cereales.

### **1.5.1 ETANOL A PARTIR DE GRANO DE CEREALES**

Para conseguir hidrolizar el almidón de estas semillas es necesario tener en cuenta su composición, ya que las enzimas que se utilizan en las distintas etapas del proceso: Mezcla, Licuefacción, Sacarificación y Fermentación, y los tiempos de residencia dependen del tipo de cereal que se utilice.

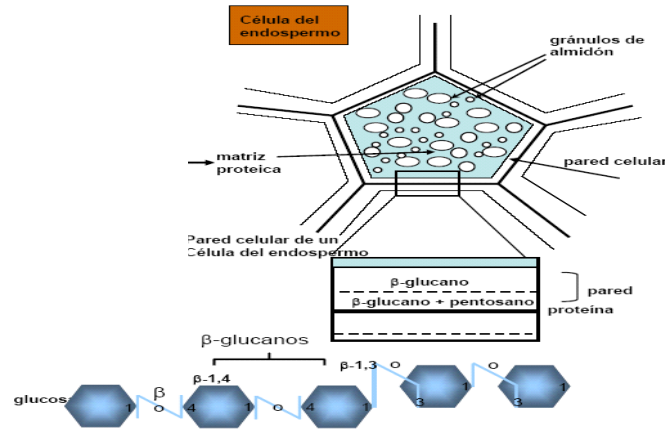
#### **1.5.1.1 Estructura de los granos de trigo y cebada**

Los granos de cereal que se van a utilizar en este trabajo son granos de trigo (*Triticum aestivum* L.) y de cebada (*Hordeum vulgare* L.), dos cereales de cultivo de la familia de las gramíneas, que actualmente se están utilizando en el proceso de producción industrial de bioetanol en la mayoría de las biorefinerías españolas (Lechón et al., 2006).

La estructura del grano cereal es muy semejante en las dos especies. El grano contiene una sola semilla, en la que se distinguen varias capas:

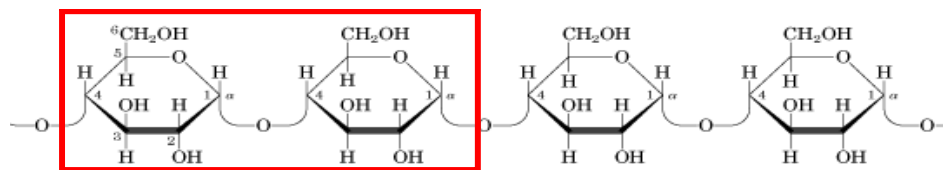
- ✓ Capa protectora o gluma: constituida fundamentalmente por fibra.
- ✓ Envolturas: formadas por tres capas que se denominan i) pericarpio, ii) mesocarpio y iii) endocarpio, constituidas fundamentalmente por celulosa y hemicelulosa, minerales, proteínas y vitaminas.
- ✓ Parte interna donde se diferencian distintas zonas: i) testa o tegmen, cubierta con aceites y pigmentos que dan color al grano; ii) aleurona o capa externa del endospermo, con gran cantidad de gránulos de grasa y proteína, iii) endospermo o albumen que contiene granos de almidón y iv) el germen o embrión, en la parte inferior del endospermo, con proteínas, aceites y vitaminas.

El endospermo (**Fig. 1.7**) representa el 85-90% del total del grano de cereal y almacena el almidón, sustrato de reserva para la germinación del embrión. Las cubiertas protectoras representan 5-10% y el embrión solo un 3%.

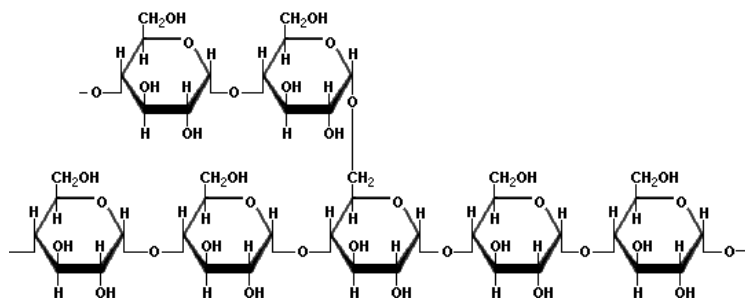


**Fig. 1.7.** Células del endospermo conteniendo gránulos de almidón.

El almidón, empaquetado en gránulos dentro del endospermo, está formado por moléculas de amilosa y amilopectina (Copeland et al., 2009). Estos dos polisacáridos están formados por cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4)-glucosídicos pero en el caso de la amilopectina existen además enlaces  $\alpha$ -(1,6)-glucosídicos que dan lugar a moléculas ramificadas, tal y como puede observarse en las **Figuras 1.8 y 1.9**.



**Fig. 1.8.** Estructura de la amilosa.



**Fig. 1.9.** Estructura de la amilopectina.

La glucosa, procedente de la hidrólisis de la amilosa y la amilopectina del endospermo con amilasas, puede ser utilizada por las levaduras, generalmente *S. cerevisiae*, como fuente de energía y para convertirla en etanol.

### 1.5.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

A continuación se describen los pasos necesarios para el procesamiento y conversión de los granos de cereal en etanol:

#### 1.5.2.1 Recepción y Procesamiento de los granos

Los granos llegan a las fábricas por diferentes medios de transporte (camión, ferrocarril o barco), y se depositan en cintas transportadoras que los llevan a los sistemas necesarios para separar el grano del resto de las impurezas (pajas, polvo de cereal, piedras, material férreo, etc). Entre las distintas maquinarias utilizadas para realizar el proceso de limpieza del cereal recibido destacan:

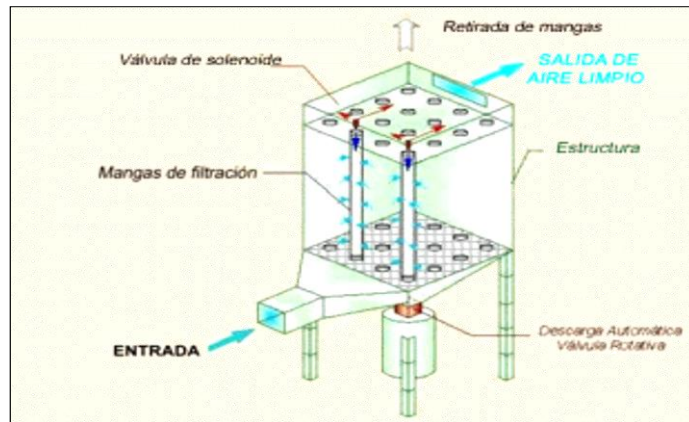
- ♣ Cribas tambor rotatorio: son tamices, con tamaño de poro variable, para separar las partículas en base a su tamaño (**Fig. 1.10**).



**Fig. 1.10.** Criba tipo tambor.

- ♣ Separadores magnéticos: sistema por el que se retiran las impurezas metálicas. Son importantes porque las partículas ferromagnéticas pueden causar daños importantes en los molinos trituradores de cereal.

- ♣ Filtros: se usan para extraer las partículas de polvo mezcladas con el aire (**Fig.1.11**).



**Fig. 1.11.** Esquema de los filtros usados para la limpieza de granos.

- ♣ Deschadoras: se utiliza para la separación continua de impurezas. En base a la velocidad de sedimentación de los granos y las impurezas pesadas (vidrio, piedras, metales, etc.).

#### 1.5.2.2 Almacenamiento de los granos

El principio de un buen almacenamiento radica en guardar los granos secos, sanos, limpios y fríos para mantener su calidad inicial.

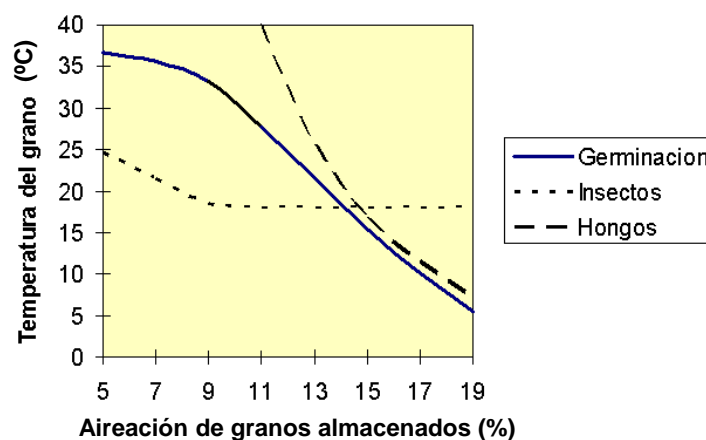
Los sistemas de almacenamiento utilizados son los conocidos como: i) Sistemas tradicionales en condiciones atmosféricas normales, siendo estas las determinadas por la presión y la temperatura ambiental; y ii) Sistemas en atmósferas modificadas, en los cuales la concentración de oxígeno disminuye aumentando la de anhídrido carbónico.

En ambos casos los granos han de almacenarse secos para evitar su deterioro. A medida que aumenta la humedad de los granos disminuye su calidad por el desarrollo de microorganismos (hongos, levaduras y bacterias), ataque de insectos o germinación de los mismos. Por esta razón, antes de almacenar el grano es imprescindible realizar una buena limpieza y desinfección de las instalaciones y tratar de mantener estas a temperaturas inferiores a



18 °C mediante aireación controlada. Para conseguirlo, generalmente se airean las salas con aire con una humedad relativa inferior al 70%, manteniendo siempre la temperatura al menos

5 °C por debajo de la temperatura del grano. El tiempo de almacenaje es un parámetro ligado directamente a la humedad y a la temperatura del grano. En la **Figura 1.12** se muestra la relación entre la temperatura y el contenido de humedad para evitar el deterioro de los granos, bien por desarrollo de insectos, crecimiento de hongos o su germinación (Brooker et al., 1992).



**Fig. 1.12.** Diagrama general de conservación de cereales.

### 1.5.2.3 Molienda

Es una etapa necesaria para reducir los granos a finas partículas facilitando la penetración del agua y la accesibilidad de las enzimas en la etapa de cocción. En la actualidad se utilizan dos tipos de molienda: Molienda Húmeda “*Wet milling*” y Molienda Seca “*Dry milling*”.

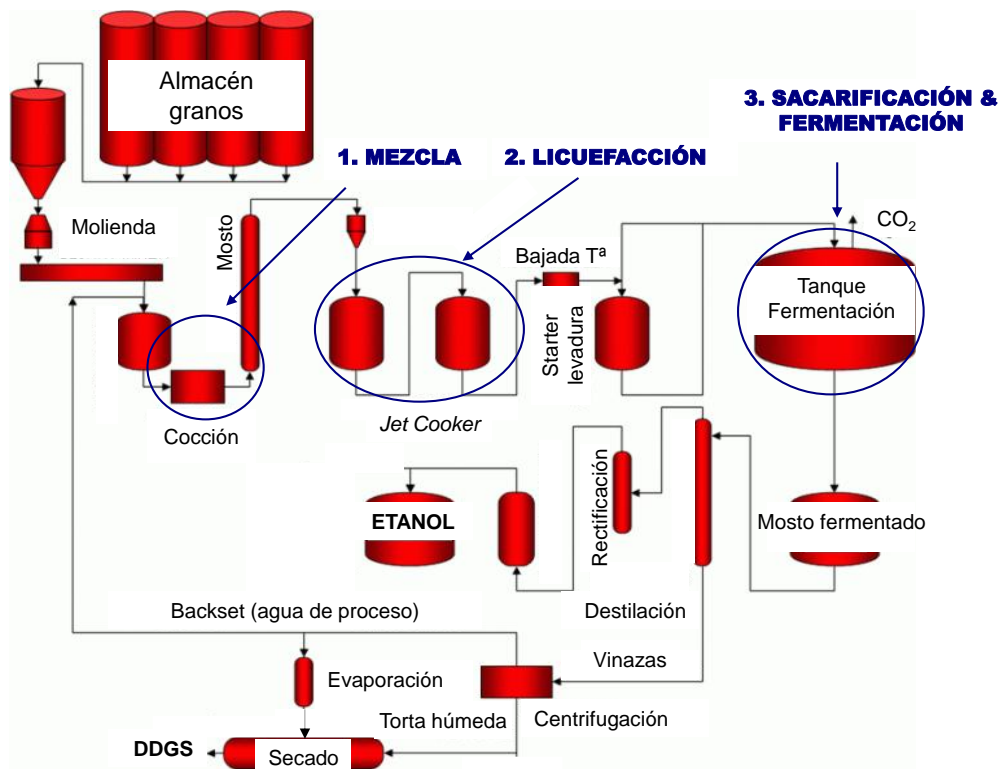
La técnica más utilizada por las empresas del sector del bioetanol es la molienda seca (67% frente al 33%) ya que tiene menores requerimientos de capital, tanto en el momento de construcción de la planta como de operación (Huang et al., 2008). El proceso de molienda seca consiste en molturar los granos del cereal mediante un proceso mecánico, normalmente utilizando molinos de martillo (*hammer mills*) o molinos de rodillo (*roller mills*) (Lyons et al., 2003).

A su vez, la molienda húmeda es utilizada por aproximadamente dos tercios de los productores en EEUU. Es un sistema elegido cuando, además de etanol, se quieren obtener otros subproductos, tales como el sirope, fructosa, dextrosa, etc (Huang et al., 2008).

### 1.5.3 ETAPAS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Una vez finalizada la molienda, la harina de cereal pasa por distintas fases con la finalidad de liberar la glucosa y que esta pueda fermentarse para obtener un alcohol con una pureza aproximada del 99,75%.

En la **Figura 1.13** se muestra un gráfico con las etapas principales del proceso de obtención del etanol a partir de granos de cereal. Molienda y etapas de procesado de la harina: Mezcla, Licuefacción, Sacarificación y Fermentación, que se detallarán a continuación.



**Fig. 1.13.** Diagrama del proceso de obtenci6n de etanol a partir de grano de cereal, adaptado de (Chan et al., 2004).

#### 1.5.3.1 Etapa de Mezcla

La harina de cereal, obtenida tras la molienda con un tama6o de partícula entre 3-6 mm, se mezcla con agua en proporci6n 3:1, a una temperatura que oscila entre 40-60 °C y un pH entre 4-6, dando lugar a una masa con una viscosidad muy elevada. Esta viscosidad se reduce tras la adici6n de  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1)

(Taniguchi y Honnda, 2009). Estas enzimas hidrolizan el almidón del endospermo a diferentes dextrinas, dando lugar a una pasta húmeda, menos viscosa y conocida como mosto. Este contiene un 20-40% en peso de sólidos y puede ser bombeado a otras partes del equipo de producción. El agua añadida es, por lo general, una mezcla de agua pura con aguas recicladas del proceso, cuyo porcentaje suele oscilar entre 20-40% (aunque en el proceso ideal el agua reciclada tendría que llegar a ser del 100%).

Las  $\alpha$ -amilasas más utilizadas son las obtenidas de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, debido a su resistencia a altas temperaturas (Declerck et al., 2000; Lyons et al., 2003; Asgher et al., 2007). Los preparados comerciales con esta actividad que más se utilizan son **Termamyl SC DS** y **Liquozyme SC DS**, comercializados por Novozymes® y **Multifect® AA 21 L**, comercializado por Genencor® (Pejin et al., 2009; Schwietzke et al., 2009). La termoestabilidad de estas enzimas, es una propiedad imprescindible para que se puedan utilizar también en la siguiente etapa (Licuefacción), en la que se requieren temperaturas más altas.

### 1.5.3.2 Etapa de Licuefacción

En la industria esta etapa se realiza mediante un sistema conocido como “*jet cooker*” (cocción con vapor a presión), en el cual una bomba y un controlador de presión de vapor hacen que se produzca una mezcla homogénea del vapor/mosto a alta presión (>7 bares) y temperatura (>100 °C). La mezcla pasa por un serpentín, con un tiempo de residencia de pocos minutos. Luego el mosto pasa a una cámara, conectada a un sistema de vacío, y la mezcla pierde presión y temperatura, generando vapor de agua y un mosto a 85 °C (Franceschin et al., 2008). Esta pérdida brusca de presión hace que el agua que se encuentra entre los gránulos de almidón se vaporice, aumentando rápidamente el volumen de la mezcla y produciéndose una rotura mecánica del gránulo que va a facilitar la acción de las enzimas. A continuación se aplican los cócteles enzimáticos con actividad xilanasas (EC3.2.1.8), endoglucanasa (EC 3.2.1.4) y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21),

enzimas que hidrolizan las pequeñas proporciones de  $\beta$ -glucanos y arabinoxilanos que forman parte de las capas protectoras del endospermo (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Li et al., 2006) y  $\alpha$ -amilasas, enzimas mayoritarias de estos cócteles enzimáticos para hidrolizar las dextrinas, que provienen de la hidrólisis de la amilosa y amilopectina en la etapa de Mezcla, a oligosacáridos de menor tamaño molecular (dextrinas intermedias, maltotriosas y maltosas). Señalar que los costes de producción a nivel industrial, en esta etapa, son altos por el elevado consumo de energía necesario para controlar la temperatura en esta etapa (principalmente en la cocción).

### 1.5.3.3 Etapas de Sacarificación y Fermentación

#### Etapas de Sacarificación

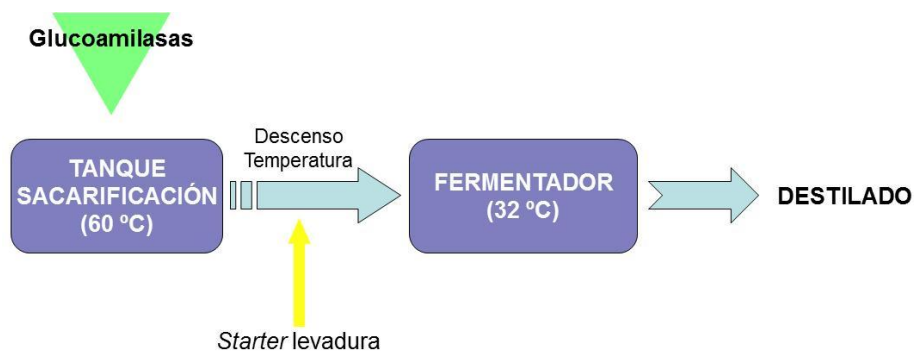
En este punto del proceso los oligosacáridos de pequeño tamaño molecular, que provienen de la etapa de Licuefacción, se transforman en glucosa por la acción de glucoamilasas (EC 3.2.1.3). Estas enzimas se obtienen generalmente de *Aspergillus niger* o de diferentes especies de *Rhizopus* (Nigam y Singh, 1995). A esta etapa del proceso se denomina **Sacarificación** y se realiza entre 60-70 °C y a un pH de 5-6. Ocasionalmente, cuando se utilizan granos de cereal que contienen bastantes proteínas en el endospermo, como es el caso del gluten en grano de trigo, los cócteles se suplementan con proteasas, generalmente endoproteasas (EC 3.4.21.4) (Romero et al., 2007), que hidrolizan estas proteínas dando lugar a péptidos que las levaduras utilizan como suplemento para su crecimiento. Estas enzimas actúan más eficazmente entre pH 6-8 y temperaturas en torno a los 50-60 °C por lo que se suelen modificar los parámetros en el proceso (Ward et al., 2009).

Esta etapa puede darse en un tanque separado o en el mismo recipiente donde se va a realizar la fermentación. Este último proceso se conoce como sacarificación y fermentación simultánea (*SSF Simultaneous Saccharification and Fermentation*) y es el más usado actualmente en la industria. Al material que procede de la

etapa de Licuefacción se añaden conjuntamente glucoamilasas y levaduras (previamente crecidas). De este modo según se va liberando la glucosa, las levaduras la transforman inmediatamente en etanol. Con esta acción se evitan posibles contaminaciones y que la glucosa liberada por las enzimas produzca un efecto inhibitorio en el proceso de fermentación (Casey y Ingledew, 1986). Sin embargo, existen algunos inconvenientes al realizar este proceso conjuntamente: i) este sistema necesita dosis mayores de enzima, ii) mayores tiempos de fermentación y iii) requiere de una continua optimización para evitar pérdidas en el rendimiento. En estas condiciones, dado que la temperatura de crecimiento de las levaduras es distinta de la temperatura óptima de los complejos enzimáticos utilizados, es necesario llegar a una solución de compromiso para conseguir los mejores rendimientos (Torija et al., 2003).

### Etapas de Fermentación

La etapa de **Fermentación** de las hexosas a nivel industrial se realiza normalmente con la levadura *S. cerevisiae* (Gray et al., 2006). Es un proceso sencillo pero es necesario controlar la aireación, temperatura y agitación para evitar que aparezcan metabolitos no deseados que disminuyan el rendimiento en la producción de etanol. Para que esta fermentación tenga lugar es necesario enfriar previamente la mezcla hasta 32 °C, añadiendo seguidamente la levadura (previamente crecida) (Lin y Tanaka, 2006; Mussatto et al., 2011). La **Figura 1.14** muestra un esquema sencillo del proceso. Bajas concentraciones de glucosa y altos niveles de oxígeno activan los procesos de respiración que se traducen en un incremento de biomasa, CO<sub>2</sub> y agua. La carencia en el medio de O<sub>2</sub> y el aumento de los niveles de azúcares desvían las rutas de obtención de energía para la levadura hacia los procesos de fermentación que producen principalmente etanol y CO<sub>2</sub>.

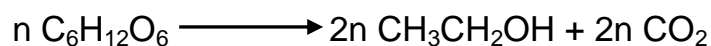


**Fig. 1.14.** Esquema de las etapas de Sacarificación y Fermentación para la producción de bioetanol a partir de grano de cereal.

Los procesos comúnmente empleados para la fermentación a escala industrial del etanol a partir de fuentes ricas en almidón presentan un par de ventajas significativas: i) las altas temperaturas de cocción permiten una alta eficiencia de sacarificación del almidón, y ii) un ambiente estéril libre de microorganismos indeseables para la fermentación alcohólica. Sin embargo, los costos de producción se ven aumentados debido al alto consumo de energía durante la cocción y la gran cantidad de enzimas empleadas (Lin y Tanaka, 2006).

### Principios Bioquímicos de la Fermentación

La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos realizan una transformación de los azúcares a etanol, CO<sub>2</sub> y energía. La reacción global general que resume todo el proceso cuando se fermentan hexosas es:

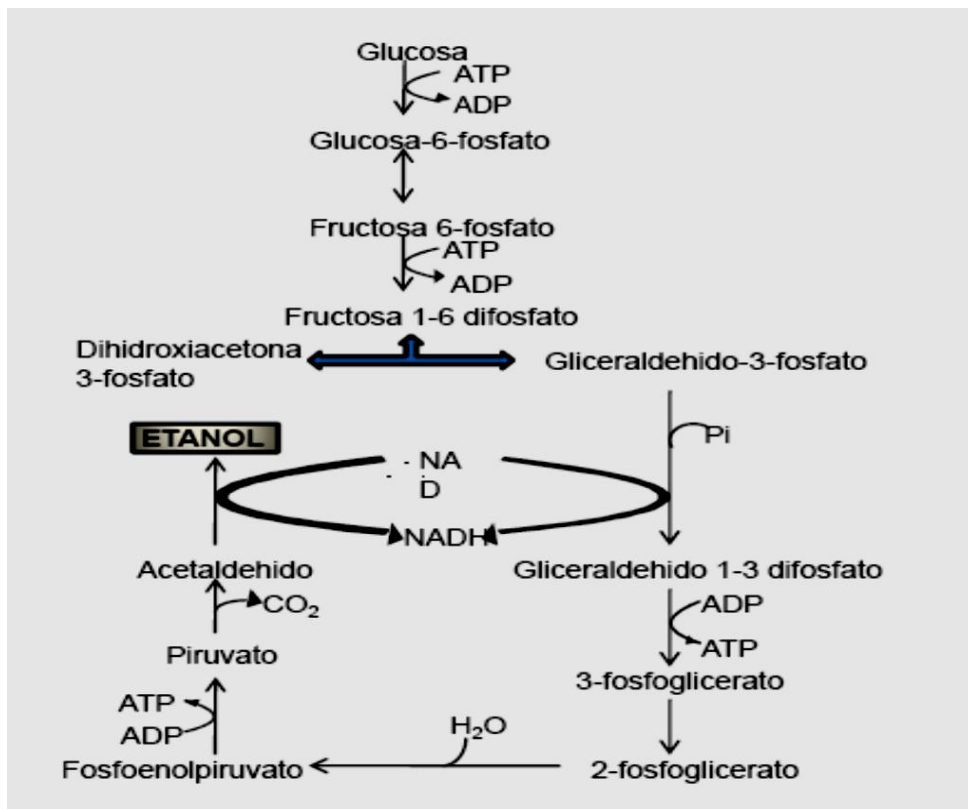


Este proceso requiere condiciones anaerobias, por lo que generalmente el O<sub>2</sub> se suplementa solo durante la inoculación, para permitir un crecimiento limitado de los microorganismos.

La transformación del azúcar a etanol en las levaduras ocurre a través de una serie de reacciones intermedias, entre la glucosa y el piruvato, conocidas como ruta glucolítica o ruta *Embden-Meyerhof-Parnas* (**Fig. 1.15**) (Lyons et al., 2003; Spector, 2009). A través de

este proceso bioquímico, las levaduras transforman los azúcares en energía, intermediarios útiles para el crecimiento de las células, etanol, dióxido de carbono y calor, generando en condiciones óptimas hasta 92% de alcohol.

Aunque, como se ha mencionado anteriormente, la levadura *S. cerevisiae* es la más utilizada para producir etanol a partir de glucosa, existen otros microorganismos capaces de producir etanol a partir de estos azúcares, aunque siguen rutas metabólicas distintas. Por ejemplo, bacterias como *Zymomonas mobilis*, transforman el azúcar a partir de la ruta *Entner-Doudoroff*, la cual, por sus características, obliga al microorganismo a producir menos biomasa (comparado con las levaduras) y canalizar más carbono hacia los productos finales (**Fig. 1.16**). En estos casos se generan mostos con menor proporción de etanol que con las levaduras (~11%) (Rogers et al., 2005).



**Fig. 1.15.** Esquema de la ruta glucolítica o de *Embden-Meyerhof-Parnas*.



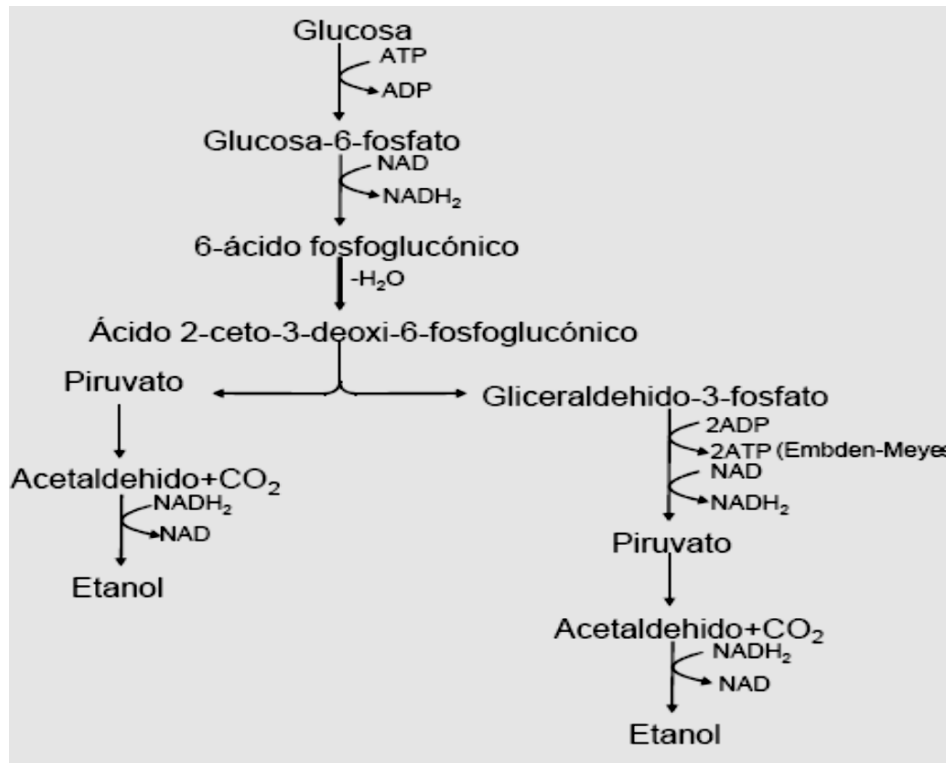
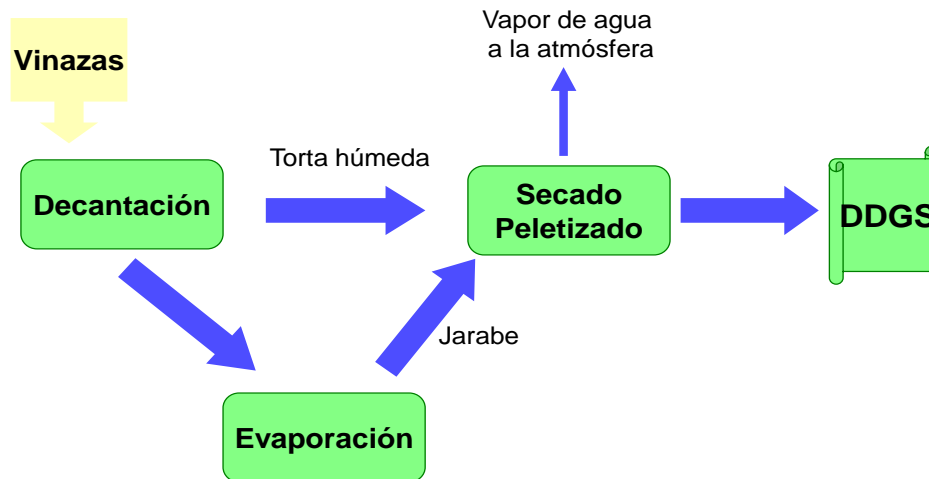


Fig. 1.16. Ruta metabólica de *Entner-Doudoroff*.

#### 1.5.3.4 Proceso de Destilación

A nivel industrial, el mosto fermentado se envía a la unidad de destilación donde se separa una solución de alcohol/agua (al 50%) de los sólidos sin hidrolizar y estos se retiran por la parte inferior del tanque. La eliminación del agua y otras impurezas del alcohol se realiza mediante un proceso de rectificación, consiguiendo un alcohol de más de un 90% de pureza y por deshidratación, mediante adsorción en tamiz molecular, se puede alcanzar un alcohol con valores superiores al 99,75% de pureza.

Las vinazas procedentes de la destilación se separan por centrifugación, de la mayor parte de los sólidos no fermentables en suspensión y se recoge en tanques de almacenaje. Una parte puede volver a utilizarse en el proceso de Licuefacción y el resto se evapora para formar un jarabe muy rico en proteínas. En la **Figura 1.17**, se muestra un esquema de dicho proceso.



**Fig. 1.17.** Esquema del proceso de obtención de DDGS a partir de vinazas.

Finalmente, los sólidos separados por centrifugación (torta húmeda con 40% de sólidos y 60% de humedad), se mezclan con el jarabe, se secan hasta que queda un 10% de humedad y se peletizan dando lugar a lo que se conoce como granos de destilación, ecoproteína o DDGS (**Fig. 1.18**), principalmente formado por fibra y celulosa (Chan et al., 2004; Xu et al., 2009).



**Fig. 1.18.** DDGS obtenidos a partir de grano de cereal.

## 1.6 PRODUCCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

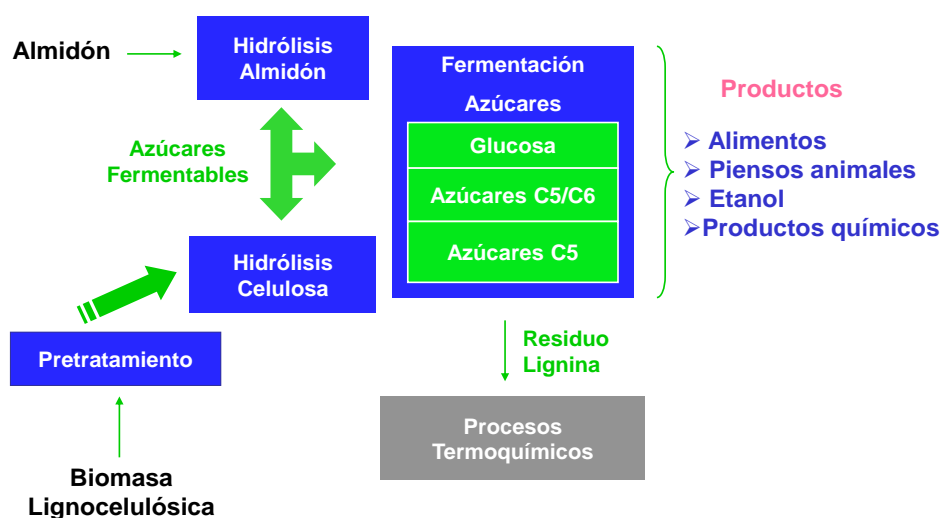
Las materias primas con alto contenido de celulosa son materias muy abundantes en la Naturaleza y su uso estudio ha tenido un creciente interés porque pueden utilizarse como fuente de energía renovable. Tal y como se ha comentado en el apartado 1.4, las tecnologías de segunda generación pueden incrementar la producción por hectárea, no interfieren en el mercado alimentario y permiten mayores reducciones de gases de efecto invernadero. Por estas razones, pueden ser consideradas una interesante alternativa a la producción de bioetanol a partir de granos de cereales. Entre las principales fuentes lignocelulósicas destacan:

- Residuos agrícolas: de cereales (trigo, arroz, cebada), bagazo (caña de azúcar, sorgo dulce) o rastrojos.
- Residuos forestales: procedentes de poda, limpiezas, árboles comerciales imperfectos y árboles no comerciales que necesiten ser talados de bosques superpoblados, con peligro de incendios o en mal estado de salud.
- Cultivos energéticos: aquellos desarrollados específicamente para combustible. Comprenden árboles de rápido crecimiento, sauces, chopos, eucaliptos, álamos híbridos, arbustos y pastos.
- Otras fuentes de biomasa: como los residuos municipales y urbanos. En este grupo se incluye la fracción orgánica sólida de los residuos industriales y domésticos. Estos no tienen valor económico en el contexto en que se generan y además pueden provocar problemas ambientales en su gestión y eliminación.

Esta biomasa lignocelulósica podría llegar a producir más de 490 billones de litros al año de etanol, 16 veces más que la actual producción mundial de bioetanol (Balat et al., 2008). Sin embargo, la gran variedad de materia lignocelulósica a utilizar y la difícil accesibilidad de los azúcares de esta, plantean retos tecnológicos que aún no han podido ser satisfactoriamente superados. Otros inconvenientes añadidos son la baja actividad específica y eficacia de las enzimas comercializadas hasta el

momento para degradar la lignocelulosa y los altos costes de producción de estos complejos enzimáticos.

En el ámbito industrial, uno de los procesos que más interés ha despertado en los últimos años es el de la **biorefinería** entendiéndose como tal, una estructura que integra procesos de conversión de biomasa y el equipamiento necesario para producir combustibles, piensos, energía y productos químicos. En la **Figura 1.19** se esquematiza a grandes rasgos un ejemplo tipo. El concepto de biorefinería es análogo al de refinерías de petróleo, que producen múltiples combustibles y productos a partir del petróleo (Kamm y Kamm, 2004; Mussatto et al., 2011).

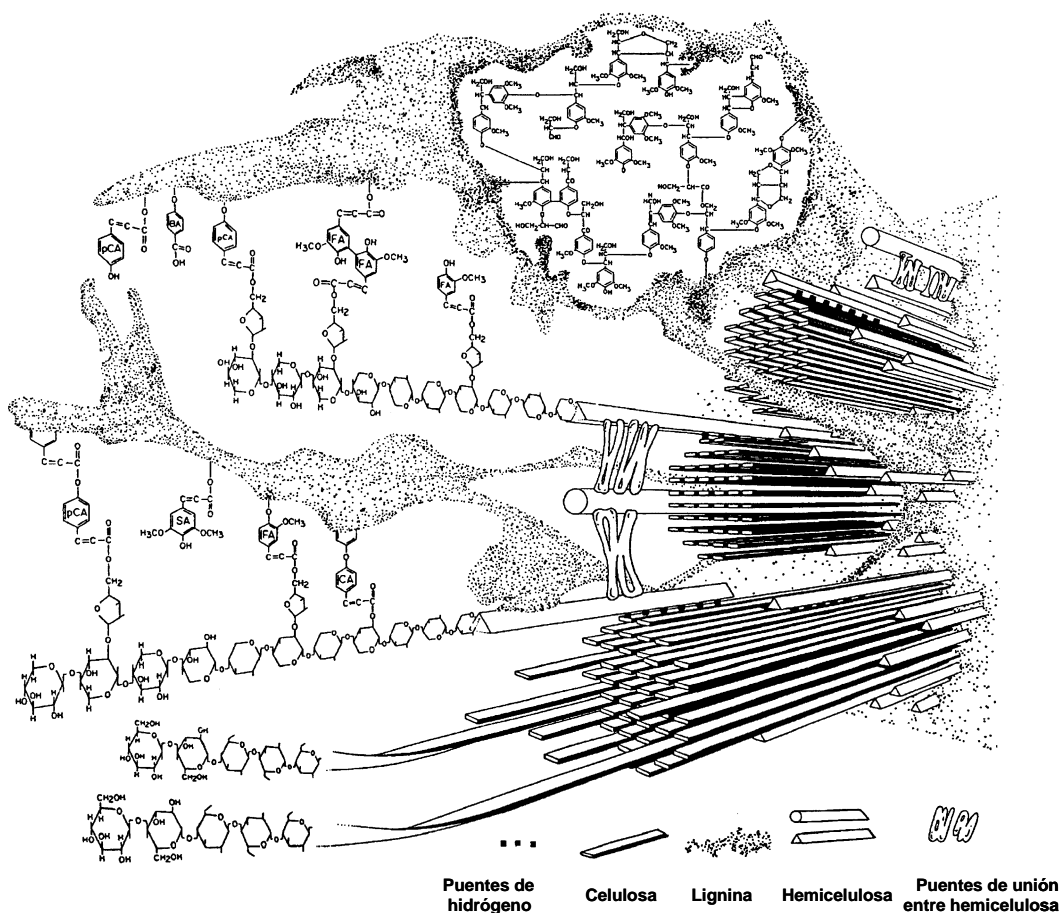


**Fig. 1.19.** Diagrama teórico de una biorefinería para la producción de etanol y otros productos de interés a partir de almidón o biomasa lignocelulósica. Esquema adaptado de (Gray et al., 2006).

Las biorefinerías industriales han sido identificadas como el camino más prometedor para la creación de una nueva industria basada en la biomasa, ya que podrían ayudar a reducir el calentamiento global del planeta, contribuyendo a un equilibrio en el balance entre el CO<sub>2</sub> fijado por las plantas y el liberado en los diferentes usos industriales de la biomasa, entre los que el bioetanol juega un papel importante (Himmel et al., 2007).

### 1.6.1 COMPOSICIÓN DE LA LIGNOCELULOSA

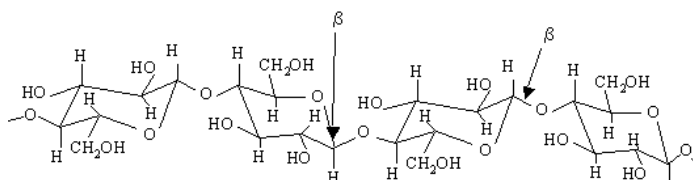
La primera etapa para la producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico implica la desestructuración de la pared celular vegetal para separar los componentes mayoritarios: celulosa hemicelulosa y lignina (**Fig. 1.20**). La cantidad de cada uno de estos polímeros varía dependiendo del tipo de planta, su edad y el tejido en el que se encuentren (Fengel y Wegener, 1984; Fujita y Harada, 1991).



**Fig. 1.20.** Representación esquemática de las relaciones entre los principales constituyentes de la pared secundaria (celulosa, lignina y hemicelulosa) de una angiosperma herbácea. Se muestran las cadenas lineales de celulosa y las ramificadas de la lignocelulosa inmersas en una matriz de lignina. Las uniones entre estos polímeros tienen lugar mediante puentes intermoleculares formados con los ácidos cinámicos (CA, *p*-cumárico; FA, ferúlico; y SA, sinápico) (Bidlack et al., 1992).

### 1.6.1.1 Celulosa

La celulosa es la molécula más abundante en la tierra ya que es el polímero mayoritario de las paredes celulares de las plantas. Es un homopolímero lineal constituido por residuos de  $\beta$ -D-glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -(1,4)-glucosídicos que forman la molécula de celobiosa, disacárido que representa la unidad constitutiva de la celulosa (**Fig. 1.21**), y que da lugar a cadenas de glucosa, denominadas glucanos, con un alto peso molecular (McKendry, 2002). Dichas cadenas se unen mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de *Van der Waals*, dando lugar a fibrillas que se alinean en paralelo formando microfibrillas, en las que se distinguen zonas cristalinas y amorfas (dependiendo de que los glucanos estén más o menos organizados, respectivamente). La orientación de las microfibrillas, puede variar en los diferentes niveles de la pared secundaria, contribuyendo a darle resistencia.



**Fig. 1.21.** Estructura química de la celulosa.

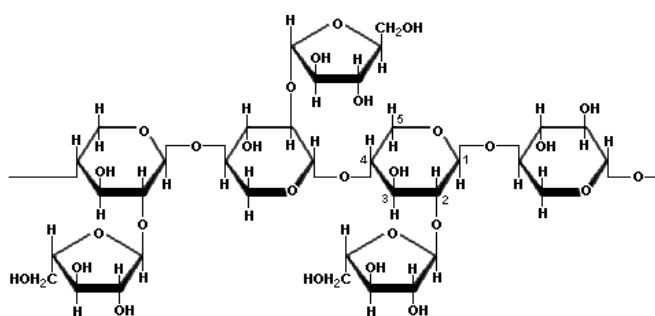
### 1.6.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el polímero más abundante, después de la celulosa, de las paredes celulares de las plantas. Está formada por polímeros de naturaleza amorfa, en cuya composición participan pentosas ( $\beta$ -D-xilosa y  $\beta$ -L-arabinosa en forma piranosa y furanosa), hexosas ( $\beta$ -D-glucosa,  $\beta$ -D-manosa y  $\beta$ -D-galactosa), desoxihexosas ( $\alpha$ -L-ramnosa y  $\alpha$ -L-fucosa) y ácidos urónicos ( $\beta$ -D-glucurónico y  $\alpha$ -D-galacturónico). La cadena principal de los polímeros presenta cortas ramificaciones y puede estar constituida por uno o varios tipos de azúcares, que son la base de su nomenclatura (xilano, manano, galactano, glucano, glucuronoxilano, galactoglucomanano, etc.). Tiene cadenas más cortas que la celulosa y gran variedad de ramificaciones que hacen que este heteropolímero sea mucho más fácil de degradar (Fengel y Wegener, 1984).

Las hemicelulosas actúan como puente de unión entre la lignina y los polisacáridos (Bidlack et al., 1992). Las unidades de las hemicelulosas

varían dependiendo del tipo de planta: i) En las maderas duras (frondosas) se encuentran principalmente formadas por xilanos, altamente sustituidos por grupos acetilados; ii) En las maderas blandas (coníferas) abundan más las hemicelulosas con galactomananos (Dahlman et al., 2003); y iii) En las plantas herbáceas, la hemicelulosa es semejante a las maderas frondosas aunque con menor proporción de grupos acetilados (Fengel y Wegener, 1984).

En el caso concreto de la mayoría de los cereales, como el trigo o la cebada, los xilanos son los azúcares dominantes y contienen una cadena principal de residuos de D-xilopiranosos unidos por enlaces  $\beta$ -(1,4). Los arabinoxilanos, presentes en las envolturas de los granos, tienen unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa distribuidas al azar, con enlaces  $\alpha$ -(1,2) y  $\alpha$ -(1,3) a lo largo de la cadena de xilosa (**Fig. 1.22**), pudiendo estar sustituidos por unidades de galactosa, ácido glucorónico o ácido 4-O-metil glucorónico (Sun y Tomkinson, 2003; Dahlman et al., 2003). Los arabinoxilanos son conocidos también como pentosanos ya que las dos unidades principales son pentosas.



**Fig. 1.22.** Estructura de arabinoxilanos.

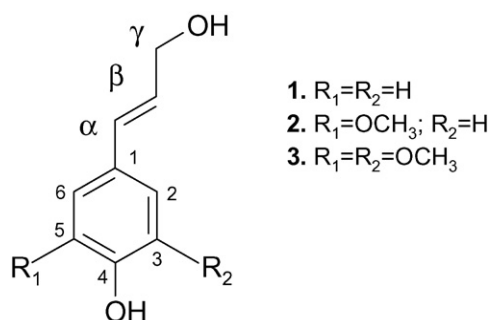
### 1.6.1.3 Lignina

La **lignina** es el tercer polímero más abundante en la superficie de la tierra, tras la celulosa y hemicelulosa (Buranov y Mazza, 2008) y su contenido en las plantas oscila entre un 28-32% en gimnospermas y 16-26% en angiospermas. La lignina da soporte estructural a los tejidos de las plantas, impermeabilidad a los elementos vasculares y proporciona resistencia frente al ataque de microorganismos y el estrés mecánico. Se trata de un polímero aromático tridimensional, sintetizado a partir de la fenilalanina a través de la ruta de los ácidos cinámicos (Higuchi, 1985;

Boerjan et al., 2003). Inicialmente se sintetizan los alcoholes cinamílicos, *p*-cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidro-3,5-dimetoxicinamílico), que actúan como precursores de la lignina y representan las diferentes unidades de este polímero, conocidas como 4-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), respectivamente (**Fig 1.23**).

La lignina de las maderas blandas está formada principalmente por unidades G, la de las maderas duras por unidades S y G y la de materiales herbáceos por unidades S, G y H. En el caso concreto de la paja de trigo, la lignina contiene unidades H, G y S en unas proporciones aproximadas de 5, 49 y 46% respectivamente (Buranov y Mazza, 2008).

Los alcoholes precursores de la lignina atraviesan la membrana plasmática en forma de  $\beta$ -glucósidos y mediante reacciones enzimáticas, en las que intervienen diferentes fenol oxidasas, se forman radicales libres, con distintas formas resonantes, que se unen formando inicialmente dímeros que vuelven a ser oxidados, se unen con nuevos monómeros o entre ellos y así progresivamente se forma el polímero (Higuchi, 1990).



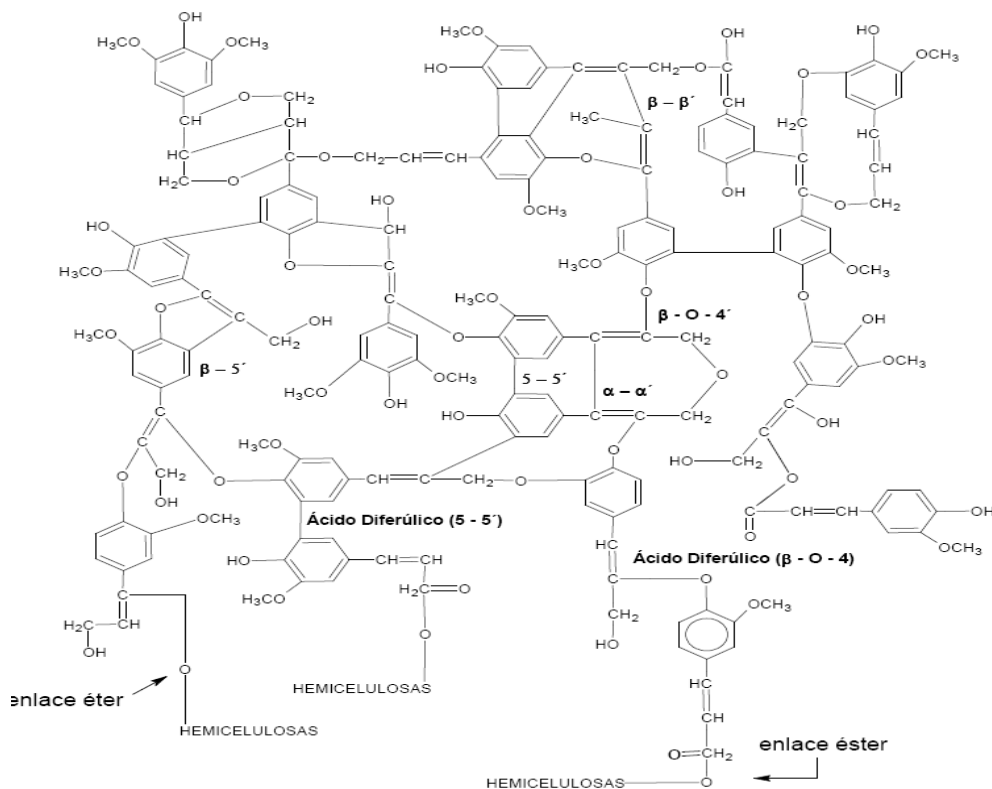
**Fig. 1.23.** Modelo de los alcoholes cinamílicos precursores de la lignina: (1) *p*-cumarílico, (2) coniferílico y (3) sinapílico.

La lignina actúa como material cementante en la pared celular, rellenando los huecos que quedan entre las fibrillas de celulosa. La lignina se une a la hemicelulosa por enlaces éter entre los hidroxilos alcohólicos. Sin embargo, en la composición de la pared celular de las plantas herbáceas, como por ejemplo en la paja de trigo (**Fig. 1.24**), son los ácidos *p*-hidroxicinámicos (principalmente *p*-cumárico, ferúlico y diferúlico) los que actúan como puentes de unión entre la lignina y la hemicelulosa mediante enlaces éster (lignina) o éter (hemicelulosa), por



reacciones de sus grupos carboxilo e hidroxilo fenólico, respectivamente (Lam et al., 2001; Sun et al., 2002).

La degradación de este polímero, tan heterogéneo, constituye un paso clave en el ciclo del carbono y la utilización de los polímeros de las paredes de las plantas en diferentes aplicaciones biotecnológicas como la producción de pasta de papel, productos químicos, nuevos materiales o bioetanol (Martínez et al., 2009). Concretamente para el caso del bioetanol, la fuerte asociación entre los componentes de la lignocelulosa impide que la degradación enzimática pueda realizarse sin un pretratamiento previo.



**Fig. 1.24.** Esquema de la lignina en la paja de trigo (Tomás-Pejó, 2010).

### **1.6.2 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE PAJA DE CEREALES**

Según el consejo Internacional de Cereales, se estimó que la producción mundial de cereales en 2010 fue de 1.776 millones de toneladas (<http://www.igc.int>). Las previsiones para la producción de cereales han aumentado mucho en los últimos años, especialmente la de maíz por el incremento que ha tenido este cultivo para ser utilizado en la producción de bioetanol 1G y la de trigo para su utilización en piensos y alimentación humana. Una cantidad substancial de los residuos generados por estos cultivos son desechados, por lo que su utilización para producción de etanol 2G puede presentar importantes ventajas, ya que no afectarían el equilibrio ecológico y no competirían, como se ha mencionado anteriormente, con las cadenas de alimentación humana y animal.

Entre las diferentes materias primas de origen lignocelulósico, la paja de trigo es muy abundante, principalmente en España y en Europa, siendo además la materia prima utilizada en este trabajo para producir etanol 2G. Por cada kilogramo de grano se produce 1,1 kg de paja (Bamaga et al., 2003). En el mundo se produjeron 680 millones de toneladas de trigo en el año 2009, lo que supone 750 millones de toneladas de paja de trigo disponibles según las estadísticas realizadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAOSTAT, 2009) (<http://www.faostat.fao.org>). Teniendo en cuenta que la paja de trigo es utilizada para alimentación animal y para el mantenimiento de suelos, alrededor del 60% de la producción de paja de trigo mundial podría asignarse para propósitos energéticos.

En España, la empresa Abengoa Bioenergía, ha finalizado la construcción de una planta piloto de bioetanol de segunda generación, con capacidad para producir 5 millones de litros anuales de bioetanol a partir residuos agrícolas como la paja de trigo, que comenzó a funcionar en plan experimental en septiembre de 2009, siendo la primera a nivel mundial en operar con esta tecnología a esta piloto. Esta planta se está utilizando para mejorar el diseño de fábricas a escala comercial que se realizarán en los próximos años, evaluar los costes de operación, identificar cuellos de botella y optimizar su operación. Situada dentro de la fábrica de Biocarburantes de Castilla y León, en Babilafuente, produce bioetanol también a partir de grano de cereal.

Ambas instalaciones comparten servicios y cadenas de proceso (<http://www.abengoabionergy.com>).

La tendencia de crear «plantas híbridas», uniendo instalaciones de primera y segunda generación que permitan disminuir los costes de implantación de nueva tecnología y aprovechar las ventajas de la economía de escala, está de acuerdo con el concepto mencionado anteriormente de conseguir que el proceso llegue a funcionar como «una biorefinería», en la que pueda aprovecharse todo el material que llegue a las plantas.

#### 1.6.2.1 Pretratamiento: *Steam explosion*

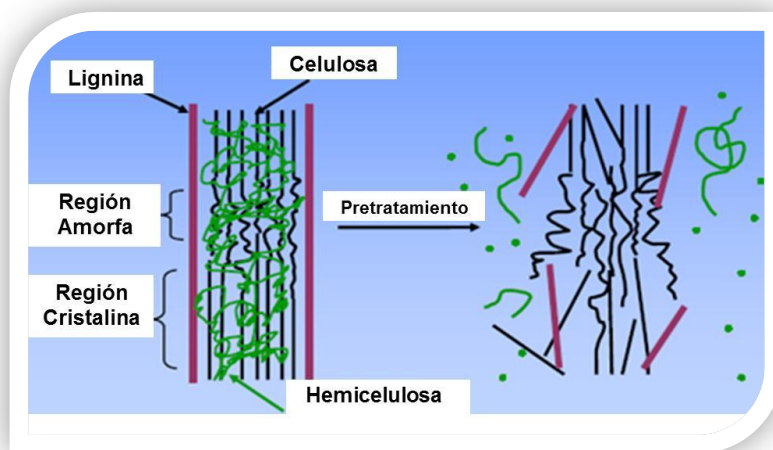
Para obtener etanol 2G a partir de residuos lignocelulósicos es necesario, tal y como se ha comentado en el apartado anterior, desestructurar la pared vegetal y dejar accesibles los azúcares presentes en la celulosa y en la hemicelulosa (20-35% de la planta). Para conseguir esto es necesario aplicar algún tipo de pretratamiento que altere la estructura de la lignina (Hari Krishna et al., 2001; Galbe y Zacchi, 2007).

El proceso de *steam explosion* (explosión a vapor) (**Fig. 1.25**) es un método físico-químico que consiste en la aplicación sobre la paja de cereales de presión (20-50 bar) y temperaturas altas (210-290 °C). Se realiza, en presencia de vapor de agua o ácido sulfúrico diluido y el tiempo de tratamiento oscila entre 1-5 min (Hamelinck et al., 2005; Mosier et al., 2005; Balat et al., 2008). El material desestructurado que se obtiene se denomina *slurry* y puede ser hidrolizado a azúcares fermentables por acción de celulasas y hemicelulasas.



**Fig. 1.25.** Imagen de una planta piloto con sistema de *steam explosion* (CIEMAT).

Esta tecnología es una de las más utilizadas para pretratar la paja de trigo ya que, se obtiene una alta recuperación de azúcares y un aumento muy significativo de la digestibilidad de la celulosa. Sin embargo, durante este pretratamiento también se produce la descomposición parcial de la hemicelulosa y la generación de compuestos, derivados de la degradación de los azúcares y la lignina que afectan negativamente el rendimiento del proceso (Hahn-Hägerdal et al., 2006). En la **Figura 1.26** se muestra un esquema del efecto provocado durante el proceso de *steam explosion*, donde se observa como se modifica la estructura de la lignina, favoreciendo la hidrólisis enzimática de los polisacáridos, tanto de la celulosa como de la hemicelulosa (**Fig.1.26**).



**Fig. 1.26.** Representación esquemática del efecto de *steam explosion* (Mosier et al., 2005).

### 1.6.2.2 Hidrólisis enzimática

Finalizado el pretratamiento de *steam explosion*, la siguiente etapa es la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa y la celulosa presentes en la materia prima pretratada, las condiciones de proceso oscilan entre un pH de 4-5 y 45-50 °C de temperatura. Para el desarrollo de esta etapa, la hidrólisis es llevada a cabo por diferentes tipos de xilanasas y celulasas (Kumar y Wyman, 2009). En el caso de las xilanasas, las enzimas mayoritarias que participan en este proceso son: i) las endo-(1,4)-xilanasas (EC 3.2.1.8); y ii) las  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37), implicadas en la despolimerización del esqueleto principal de los xilanos y su transformación en xilosa, respectivamente.

En el caso de las celulasas, se requiere la acción sinérgica de las diferentes enzimas que se conocen con el nombre de celulasas: i) las endo- $\beta$ -(1,4)-glucanasas (EC 3.2.1.4) que hidrolizan las cadenas de celulosa para producir polisacáridos de menor longitud, ii) las exo- $\beta$ -(1,4)-glucanasas (EC 3.2.1.91) que hidrolizan los extremos terminales no reductores de estas cadenas, liberando unidades de celobiosa, y iii) las  $\beta$ -(1,4)-glucosidasas (EC 3.2.1.21) que hidrolizan la celobiosa y otros oligómeros a glucosa (Lynd et al., 2002).

### 1.6.2.3 Fermentación de los azúcares a etanol

Una vez liberados los azúcares potencialmente fermentables presentes en la biomasa, es necesario el uso de levaduras capaces de fermentar estos azúcares hasta etanol y continuar este proceso. Como se ha ido describiendo hasta ahora, para que el rendimiento final de etanol sea eficiente es necesario una hidrólisis completa de los azúcares existentes en la biomasa lignocelulósica (tanto los procedentes de la celulosa como de la hemicelulosa) y una eficaz fermentación de estos a etanol.

En la actualidad se están ensayando diferentes levaduras capaces de fermentar los C6, fundamentalmente de la especie *S. cerevisiae*, que a pesar de los inhibidores generados durante el proceso de *steam explosion* pueden fermentar la glucosa procedente de la celulosa (Almeida et al., 2007). Sin embargo, a pesar de que se han descrito bacterias entéricas, como *Escherichia coli* y *Klebsiella oxytoca*, y levaduras, como *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *Pichia stipitis* capaces de fermentar pentosas (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Van Vleet y Jeffries, 2009), estas solo pueden hacerlo a partir de medios sintéticos donde no se encuentran los inhibidores procedentes de la *steam explosion*. Hasta la fecha, se está tratando de encontrar nuevos microorganismos o manipular, mediante técnicas de ingeniería genética, microorganismos ya conocidos que superen estas barreras.

## 1.7 LACASAS FÚNGICAS

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno óxido-reductasas, EC 1.10.3.2), junto con las peroxidasas, forman parte del sistema enzimático que participa en la degradación de la lignina en la mayoría de los basidiomicetos que degradan este heteropolímero. Las lacasas forman parte de un grupo bastante homogéneo de fenol oxidasas, que catalizan la oxidación monoelectrónica de difenoles y aminas aromáticas, eliminando un electrón y un protón del grupo hidroxilo o amino para dar lugar a radicales fenoxilo o amino, respectivamente (Leonowicz et al., 2001).

Las peroxidasas pueden ser de varios tipos: i) lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14), enzima con alto potencial redox que oxida preferentemente compuestos aromáticos no fenólicos mediante la sustracción de un único electrón del anillo aromático; ii) manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) que requiere  $Mn^{2+}$  para cerrar su ciclo catalítico y oxida preferentemente compuestos fenólicos; y iii) la peroxidasa versátil (EC. 1.11.1.16), descrita inicialmente en *Pleurotus eryngii* como un tipo de manganeso peroxidasa capaz de oxidar  $Mn^{2+}$  y sustratos no fenólicos típicos de la lignina peroxidada (Martínez et al., 1996), y que por tanto comparte propiedades con las otras dos peroxidasas mencionadas anteriormente.

La principal diferencia entre lacasas y peroxidasas radica en la naturaleza del aceptor electrónico ya que mientras las lacasas utilizan  $O_2$ , aceptor no limitante presente en la atmósfera, las peroxidasas requieren para su actividad catalítica la presencia de  $H_2O_2$ . Esta es una de las principales razones por la que las lacasas se utilizan preferentemente en diferentes aplicaciones industriales.

Además, aunque el potencial redox de las lacasas sea menor que el de las peroxidasas ligninolíticas, su rango de actividad puede expandirse a compuestos de naturaleza no fenólica a través del denominado sistema lacasa-mediador (**Fig. 1.29**). En este sistema, metabolitos de bajo peso molecular, previamente oxidados por lacasas, actúan como agentes que son esenciales en la oxidación de compuestos no fenólicos por estas enzimas (Bourbonnais y Paice, 1990; Martínez et al., 1994).



**Figura 1.29.** Representación esquemática del ciclo de oxidorreducción de sustratos catalizado por lacasas en presencia de mediadores.

La mayoría de las lacasas pertenecen a la superfamilia de las oxidasas azules, que engloba a pequeñas proteínas (azulina, plastocianina o rustacianina) y a las proteínas de la familia de las oxidasas multicobre, a la que pertenecen también la ascorbato oxidasa de la plantas o la ceruloplasmina del plasma de los mamíferos (Messerschmidt y Huber, 1990; Messerschmidt et al., 2001). Esta enzima se comenzó a estudiar a finales del siglo XIX, cuando se descubrió en el árbol japonés de la laca *Rhus vernicifera* (Thurston, 1994). Hasta finales del siglo XX, las lacasas se habían encontrado únicamente en organismos eucariotas (Mayer y Staples, 2002; Dittmer et al., 2004) pero también se han caracterizado en eubacterias (Martins et al., 2002), actinomicetos (Endo et al., 2003) e incluso arqueobacterias (Claus, 2003).

La función fisiológica de estas enzimas depende del tipo de organismo que las produce (Thurston, 1994; Alcalde, 2007). En plantas están implicadas en la síntesis de lignina. En hongos ascomicetos se ha asociado con la coloración de los conidios, en hongos fitopatógenos con los procesos iniciales de ataque al hospedador y en infecciones producidas por hongos oportunistas, en enfermos inmunodeprimidos se relaciona con un posible factor de virulencia (Zhu y Williamson, 2004). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados con la función de esta enzima están relacionados con su papel en la degradación de la lignina y otros compuestos aromáticos que causan problemas medioambientales.

### 1.7.1 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS LACASAS

En general, las lacasas son proteínas monoméricas con masas moleculares entre 50 y 100 kDa, aunque se han descrito formas multiméricas como la lacasa de *Agaricus bisporus*, que se presenta como dímeros de unidades iguales o incluso en forma de tetrameros como la

lacasa de *Podospora anserina* (Baldrian, 2006). Son, además, glicoproteínas con un contenido en carbohidratos entre el 10 y el 45% (Thurston, 1994; Claus, 2004), aunque se han descrito lacasas con solamente un 1% de glicosilación (Muñoz et al., 1997). El contenido de carbohidratos puede jugar un papel importante en la estabilidad estructural de la proteína y en su protección frente a procesos de proteólisis e inactivación por radicales (Yoshitake et al., 1993; Ko et al., 2001).

Destacar que son proteínas muy estables, con temperaturas óptimas entre 50 y 70 °C (Morozova et al., 2007), aunque se pueden encontrar enzimas termoestables como la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, que solo se inactiva tras 3 horas a 75 °C (Litthauer et al., 2007). El pI de estas enzimas oscila entre 2,6 y 4,5 y suelen oxidar diferentes sustratos en un amplio rango de pH, entre 2 y 8,5, aunque su máxima actividad suele encontrarse entre pH 3 y 5 (Leonowicz et al., 2001; Morozova et al., 2007). El potencial de óxido-reducción de estas enzimas oscila entre 0,5 y 0,8 V. Como se ha mencionado anteriormente, catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos, desde compuestos fenólicos (*orto* y *para* difenoles, metoxifenoles, etc) a aminas aromáticas (Yaropolov et al., 1994) e incluso se ha descrito, que pueden llevar a cabo desmetilaciones y deshalogenaciones en el caso de compuestos sustituidos con grupos metoxilos (Kirk y Farrell, 1987). Su actividad frente a los diferentes compuestos es dependiente del pH, ya que el potencial redox de estos compuestos disminuye a medida que se incrementa el pH, y puede ser inhibida por iones inorgánicos como cloruros y fluoruros o por compuestos orgánicos como cisteína, azida o ácido tioglicólico (Morozova et al., 2007).

### **1.7.2 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS LACASAS Y SISTEMAS LACASAS-MEDIADOR**

Los basidiomicetos son hongos ligninolíticos con un sistema muy inespecífico capaces de degradar o transformar la lignina y otros compuestos aromáticos recalcitrantes. Debido a estas características pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones biotecnológicas, relacionadas principalmente con el sector paplero (biopulpeo,



bioblanqueo o degradación de compuestos que producen depósitos indeseables en la producción de pasta de papel) o con la degradación de contaminantes que producen problemas medioambientales (Aust y Benson, 1993; Behrendt et al., 1995; Breen y Singleton, 1999; Gutiérrez et al., 2001; Watanabe, 2001). Sin embargo, dichos procesos son muy lentos y la utilización de algunas de las enzimas que producen estos hongos puede presentar ventajas, especialmente en procesos específicos en los que la utilización de estas enzimas puede aportar un mayor control sobre el producto final generado, condicionado principalmente por la especificidad y estereoselectividad de estos catalizadores biológicos.

Estas enzimas se han aplicado con éxito en la **industria alimentaria**, en la clarificación de mosto de vino, jugos de frutas o cerveza, mediante la eliminación de los fenoles libres, que tras el tratamiento enzimático polimerizan y pueden eliminarse con facilidad (Servili et al., 2000; Minussi et al., 2007). También se ha investigado mucho sobre su aplicación en el **blanqueo** enzimático de pastas de papel como alternativa al proceso de blanqueo con reactivos químicos clorados, que generan organoclorados muy tóxicos, produciendo un elevado impacto medioambiental. Existen numerosos estudios en la literatura que ponen de manifiesto los resultados positivos de pastas blanqueadas con el sistema lacasa-mediador, tanto utilizando pasta de frondosas como de materiales lignocelulósicos que proceden de plantas herbáceas (García et al., 2003; Arias et al., 2003; Camarero et al., 2004; Ibarra et al., 2006). También se ha puesto de manifiesto la aplicación de lacasas para **degradar compuestos aromáticos** recalcitrantes que producen problemas medioambientales. Entre estos compuestos podemos encontrar compuestos fenólicos, como el 2,4-diclorofenol, que pueden ser transformados directamente por la lacasa; o hidrocarburos aromáticos policíclicos siendo en este caso indispensable el uso de mediadores para llevar a cabo su oxidación (Rodríguez et al., 2004). La mayoría de estos estudios se han realizado utilizando mediadores sintéticos, como el HBT y ABTS, utilizados con éxito en la oxidación de benzo(a)pireno y antraceno por la lacasa de *Trametes versicolor* (Collins et al., 1996; Johannes et al., 1996) o benzo(a)pireno por las lacasas de *P. eryngii* (Rodríguez et al., 2004). Una alternativa al uso de estos mediadores

sintéticos es el uso de mediadores naturales como fenol, anilina, ácido 4-hidroxibenzoico o alcohol 4-hidroxibenzílico, usados con igual eficiencia en la degradación de diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos por la lacasa de *T. versicolor* (Johannes y Majcherczyk, 2000) y *P. eryngii* (Cañas et al., 2007). Otros contaminantes de naturaleza aromática también problemáticos para el medioambiente, debido a su abundancia y persistencia, son los **pesticidas**. La mayoría de estos compuestos son xenobióticos, con estructura orgánica sintética que suele tener, entre otros, átomos de cloro, fósforo o azufre (Jáuregui et al., 2003). Algunos de estos pesticidas han sido degradados por la lacasa en presencia de ABTS (Amitai et al., 1998) o el fungicida ciprodinil, en presencia de compuestos fenólicos de origen natural, siendo el siringaldehído el más eficaz (Kang et al., 2002).

Por otro lado, la degradación de colorantes industriales supone otro de los campos de aplicación importante para las lacasas. La industria textil genera grandes cantidades de **tintes orgánicos sintéticos** en sus efluentes, generalmente con anillos aromáticos, que suponen una importante fuente de contaminación ambiental. Atendiendo a su estructura, existen tres tipos principales de tintes; azo, ftalocianina y antraquinona (Hao et al., 2000). Estos compuestos contienen grupos nitro y sulfónico como sustituyentes, lo cual impide la decoloración en procesos aeróbicos convencionales (Wong y Yu, 1999). Además, el 50% de estos tintes son de tipo azo, pudiéndose transformar en compuestos carcinogénicos (aminas aromáticas) en condiciones anaerobias. Mediante el uso de lacasas, en presencia o ausencia de mediadores, es posible llevar a cabo la degradación de un amplio rango de estructuras químicas de estos colorantes (Blánquez et al., 2004; Almansa et al., 2004; Camarero et al., 2005) e incluso decolorar eficazmente mezclas comerciales de estos (Zouari-Mechichi et al., 2006).

También la lacasa puede utilizarse para revalorizar algunos **residuos agrícolas**, como los que proceden de la producción de aceite de oliva. Estos residuos, muy abundantes en España y otros países mediterráneos, podrían utilizarse como fertilizantes ya que contienen gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Jaouani et al., 2005). Sin embargo, debido a la presencia de gran cantidad de fenoles libres se ha demostrado que afecta negativamente a las plantas y

microorganismos del suelo (Capasso et al., 1995; Lamarino et al., 2009). Estudios realizados tratando el residuo de aceite de oliva con la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y *Coriolopsis rigida* han puesto de manifiesto que los fenoles libres del residuo se polimerizan tras el tratamiento enzimático detoxificando este residuo (Jaouani et al., 2005; Saparrat et al., 2009).

Otro campo de aplicación para la lacasa es la coloración del cabello en **industria cosmética**. En la actualidad para los tintes cosméticos se utilizan oxidantes e intermediarios químicos que se fijan al cabello y pueden dañarlo. Existen trabajos y patentes que proponen el uso de lacasas para polimerizar compuestos fenólicos de origen natural para su uso en coloración de cabellos (Nagai et al., 2003; Tetsch et al., 2006; Jeon et al., 2010).

Finalmente, las lacasas también pueden aplicarse en **síntesis orgánica** de compuestos de interés industrial, por ejemplo para la oxidación de grupos hidroxilo de derivados de azúcares, la producción de polímeros complejos (como el policatecol para resinas cromatográficas) o la síntesis de agentes farmacológicos (antitumorales, nuevos derivados de antibióticos o antioxidantes) (Abadulla et al., 2000; Mai et al., 2002; Marzorati et al., 2005; Uyama y Kobayashi, 2006; Baratto et al., 2006; Kunamneni et al., 2008).

## **1.8 OBJETIVOS**



Como se ha comentado a lo largo de la Introducción, las investigaciones para producir bioetanol se han potenciado en los últimos años por el papel que este alcohol puede tener como aditivo de las gasolinas, con el fin de reducir el consumo de derivados del petróleo en automoción y contribuir a la disminución de la contaminación ambiental generada por los combustibles. En la actualidad se está comercializando en diferentes países etanol 1G, aunque sería conveniente optimizar el rendimiento proceso, y se ha comenzado a estudiar a escala piloto la posibilidad de producir etanol 2G, a partir de biomasa lignocelulósica, con la finalidad de incrementar la producción de este alcohol sin que esto afecte a la producción de cultivos alimentarios.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los objetivos generales de esta Tesis fueron: i) maximizar el rendimiento global del proceso de producción de bioetanol 1G, tratando de aumentar su rendimiento mediante un mayor aprovechamiento de los azúcares presentes en los granos de cereales, utilizando granos de trigo como modelo de proceso y, ii) tratar de estudiar el papel de las lacasas, enzimas previamente estudiadas en nuestro laboratorio, en la producción de etanol 2G, a partir de paja de trigo pretratada con *steam explosion*.

Para conseguir estos objetivos generales se propusieron varios objetivos más concretos:

- i) Caracterización de las materias primas utilizadas para la producción de bioetanol 1G en España: trigo y cebada.
- ii) Estudio y caracterización de complejos enzimáticos comerciales para la producción de bioetanol 1G y 2G.
- iii) Selección de cócteles para la producción de etanol 1G y optimización de dosis enzimáticas.
- iv) Papel de las lacasas fúngicas en la producción de bioetanol 2G, a partir de paja de trigo pretratada con *steam explosion*.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**





## 2.1 MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS

### 2.1.1 GRANOS DE TRIGO Y CEBADA

En este apartado se ha caracterizado el material más utilizado en España para la obtención de bioetanol a partir de granos de cereales. Los granos de trigo y cebada, procedían de las fábricas de Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías (ABNT): “Biocarburantes de Castilla y León”, situada en Babilafuente (Salamanca), y “Ecocarburantes Españoles”, en Cartagena (Murcia), respectivamente.



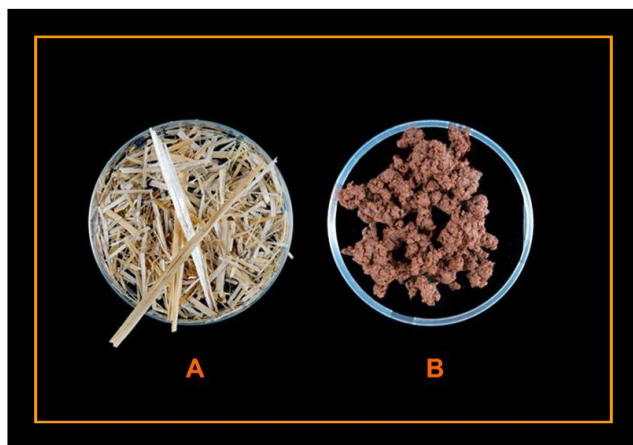
**Fig. 2.1.** Granos de trigo y cebada, y las harinas de estos granos, utilizadas para la obtención de etanol 1G.

En ambos casos, los granos se molieron, utilizando un molinillo, para conseguir una harina integral no refinada, constituida por una mezcla de harina y salvado de cereal, con un tamaño de partícula de aproximadamente 0,6 mm (**Fig. 2.1**). Por motivos prácticos se utilizó el método de molienda seca, explicado en detalle en el apartado 1.5.2.3. Las harinas se mantuvieron en estufa de aireación a 65 °C durante 24 h para eliminar toda la humedad residual antes de procesarlas.

La harina integral de trigo, así obtenida, fue también el material de partida para los ensayos de optimización del proceso de producción de bioetanol.

### 2.1.2 SLURRY DE PAJA DE TRIGO

Para los ensayos de detoxificación de la biomasa lignocelulósica se utilizaron *slurries* procedentes de paja de trigo (**Fig. 2.2**) suministrados por ABNT y el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).



**Fig. 2.2.** Muestra de paja de trigo (A) y *slurry* de esta paja (B) obtenido tras el tratamiento con *steam explosion*.

Estos *slurries* de paja de trigo se obtienen mediante un tratamiento de *steam explosion*. La aplicación de este pretratamiento, tal y como se describió en el apartado 1.6.2, contribuye a desestructurar la pared celular vegetal, solubilizando la lignina, y favoreciendo la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Se utilizaron dos tipos distintos de *slurries*: i) el proporcionado por CIEMAT, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura al que denominaremos en el trabajo *slurry* agua y ii) el suministrado por ABNT, obtenido en condiciones similares pero en presencia de ácido sulfúrico diluido, denominado en el trabajo *slurry* ácido.

En ambos casos, se determinó el pH y el peso seco de cada uno de los *slurries*.

## 2.2 MICROORGANISMOS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 2.2.1 *Corioloopsis rigida*

El basidiomiceto *C. rigida*, utilizado para producir lacasa, fue aislado e identificado en Argentina y se encuentra en la colección del Instituto Spegazzini (CLS 232), la colección Jaime Ferrán del Centro de Investigaciones Biológicas (A765) y la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 20449). Los medios de cultivo utilizados para mantener y cultivar este hongo fueron:

- ♦ Medio agar-malta: se utilizó para el mantenimiento y conservación del hongo. La composición de este medio es de 20 g/L de extracto de malta y 20 g/L de agar.
- ♦ Medio glucosa-peptona-extracto de levadura: es un medio *Czapek-Dox* modificado y suplementado con  $\text{Cu}^{2+}$  para inducir la producción de la lacasa (Saparrat et al., 2002) (**Tablas 2.1 y 2.2**).

**Tabla 2.1.** Composición del medio.

Componentes	g/L
Glucosa	10
$(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	2
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
KCl	0,5
$\text{CuSO}_4$	0,24
Extracto de levadura	1
Peptona	5
Elementos traza	1 mL

**Tabla 2.2.** Composición de la solución de elementos traza.

Componentes	mg/L
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$	100
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	70
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	50
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	10
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	10

Los medios descritos están referidos a un volumen final de un litro. Como criterio general todos los medios se esterilizaron en autoclave (120 °C, 20 min). Sin embargo, los medios que contenían glucosa en su composición se autoclavaron a 110 °C durante 20 min para evitar la caramelización del azúcar.

Para obtener la lacasa, los cultivos del hongo *C. rigida* se realizaron en matraces Erlenmeyer de 1 L de capacidad con 200 mL de medio (20% v/v), incubándolos tras la inoculación en un agitador orbital a 28 °C y a 150 rpm. Como inóculo se utilizó una suspensión de micelio triturado crecido durante 5 días en el mismo medio, utilizando 5 mL de inóculo para 200 mL de medio (aproximadamente 3 mg de micelio por mL).

### 2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Los experimentos de fermentación para producir bioetanol a partir de harina de trigo se llevaron a cabo utilizando una cepa comercial liofilizada de *S. cerevisiae* (Fermentis LPA 3035). El liófilo se reconstituyó con una solución de suero salino al 1% durante 30 min antes de utilizarlo como inóculo para: i) los hidrolizados enzimáticos procedentes de harina de trigo (apartado 2.6.3.2) y ii) los *slurries* agua y ácido (apartado 2.7.2). En ambos casos se utilizó 1 mL de una suspensión de levaduras con una densidad óptica de 0,7, determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 620 nm.

## 2.3 ENZIMAS Y CÓCTELES ENZIMÁTICOS

### 2.3.1 CÓCTELES COMERCIALES

A lo largo de este trabajo, se han empleado distintos cócteles enzimáticos comerciales, recogidos en la **Tabla 2.3** y cedidos por Novozymes<sup>®</sup> y Genencor<sup>®</sup>. En esta tabla se representan los nombres de los cócteles comerciales y las actividades mayoritarias descritas en ellos. Para completar su caracterización se valoraron las diferentes actividades enzimáticas que pueden participar en la hidrólisis de la biomasa, bien para obtener etanol 1G (utilizando harina de trigo, apartado 1.5.4) o etanol 2G (utilizando paja de trigo, apartado 1.6.2).

**Tabla 2.3.** Complejos enzimáticos comerciales utilizados a lo largo de este trabajo. Todos los cócteles fueron cedidos por Novozymes<sup>®</sup>, excepto el complejo Accellerase, que fue cedido por Genencor<sup>®</sup>.

Nombre comercial	Complejo enzimático	Actividad descrita
Alcalase 2,5 L	1	Proteasa
Liquozyme SC DS	2	$\alpha$ -amilasa
Spirizyme Fuel	3	Glucoamilasa
Viscozyme Barley	4	Amilasa / Celulasa
Viscozyme Wheat	5	Endoglucanasa / Xilanasa
Ultraflo L	6	Endoglucanasa
Viscozyme Rye	7	Endoglucanasa / Xilanasa
Celluclast 1,5 L FG	8	Celulasa
Novozym 50010	9	$\beta$ -glucosidasa
NS-50012	10	Kit Biomasa
NS-50013	11	
NS-50030	12	
NS-22002	13	
Novozym 50070	14	$\beta$ -1,3-glucanasa
Accellerase 1000	15	$\beta$ -glucosidasa / Endoglucanasa

### 2.3.2 LACASAS FÚNGICAS

Para los ensayos de tratamiento de *slurry* de paja de trigo se han utilizado lacasas comerciales procedentes de *Trametes villosa* (Novozymes®) o las lacasas del hongo basidiomiceto *C. rigida*, producidas en nuestro laboratorio (apartado 2.2.1).

Tras 20 días de incubación, se obtuvo el crudo enzimático de *C. rigida* con actividad lacasa. El líquido de cultivo se separó del micelio mediante centrifugación, usando una centrífuga Sorvall RC 5C PLUS con un rotor SLA 1500 a 12000 rpm. Las proteínas presentes en el líquido de cultivo se concentraron mediante ultrafiltración tangencial (Filtron), utilizando membranas de 5 kDa (Minisette, Filtron). El flujo tangencial fue proporcionado por una bomba peristáltica (Masterflex, modelo 7518-02). El crudo enzimático así obtenido se dializó frente a tampón acetato sódico 10 mM, pH 5 y se guardó a -20 °C hasta su utilización, permaneciendo las enzimas estables durante meses. Este crudo enzimático solo presentaba actividad lacasa, no detectándose ninguna actividad peroxidasa secretada por este hongo, ni en el cultivo ni en el crudo obtenido tras la ultrafiltración. Por esta razón, se empleó directamente para los tratamientos el crudo enzimático.

## 2.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Los ensayos que se detallan a continuación se realizaron a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

Para preparar los sustratos y reactivos en las diferentes determinaciones se utilizaron diferentes tampones que, salvo que se indique otra cosa, se prepararon utilizando la solución del ácido correspondiente, a la molaridad deseada, y ajustando el pH con el volumen necesario de una solución de NaOH 1N. El pH se midió utilizando un pH-metro Crison (modelo Basic 20) con un electrodo Liq-Glass 238000 (Hamilton) para medir el pH de los siguientes tampones:

- ♦ Tampón acetato sódico 50 mM pH 5.
- ♦ Tampón fosfato 50 mM pH 6.

- ♦ Tampón citrato sódico 0,1 M pH 3, pH 4 y pH 5.
- ♦ Tampón citrato-fosfato-borato (CFB): este tampón tiene la ventaja de que se puede utilizar en un amplio rango de pH (2-12) para valorar estabilidad de las enzimas y pH óptimos. Para su preparación se mezcló una solución de ácido fosfórico 33,3 mM, ácido ortobórico 66 mM e hidróxido sódico 334 mM (solución A), con la cantidad necesaria de HCl 100 mM (solución B) para conseguir el pH deseado (Geigy, 1965).

#### 2.4.1 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se determinó por el método de Bradford, (1976), utilizando el reactivo y procedimiento descrito por Bio-Rad (*Protein Assay Dye Reagent*). Este ensayo se basa en el cambio de absorbancia de 465 a 595 nm que experimenta una solución ácida del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* al unirse a las proteínas. Todas las valoraciones se hicieron por triplicado. Los datos de absorbancia fueron referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino a una concentración entre 2 y 20 µg/mL. La recta de calibración obtenida, lineal hasta valores de 0,6 de  $A_{595}$ , fue:

$$A_{595} = 0,0423c + 0,00282 \quad (R^2 = 0,99)$$

#### 2.4.2 VALORACIÓN DE SUSTANCIAS REDUCTORAS

La concentración de sustancias reductoras (SR), se determinó mediante el método de Somogyi y Nelson (1945). Este método se basa en la oxidación de azúcares y sustancias reductoras por compuestos orgánicos cúpricos en solución alcalina. El cambio en el estado de oxidación del ión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$  se reduce a  $\text{Cu}^+$  por el grupo aldehído del azúcar), se pone de manifiesto al añadir una solución de molibdato que produce un cambio de color y puede seguirse espectrofotométricamente a 540 nm. La composición de los reactivos empleados se describe a continuación:



- ♣ Somogyi I: 144 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 12 g tartrato sódico-potásico, 24 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 16 g  $\text{NaHCO}_3$  en un volumen final de 800 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .
- ♣ Somogyi II: 36 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 4 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en un volumen final de 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .
- ♣ Nelson: 50 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  en 900 mL de agua y 42 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Esta disolución se mezcló con otra que contenía 6 g  $\text{Na}_3\text{AsO}_4$  en 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .

El procedimiento seguido fue el siguiente: a un volumen de muestra (generalmente 200  $\mu\text{L}$ ), se le añadió el mismo volumen del reactivo Somogyi (Somogyi I: Somogyi II, 1:4). La mezcla se hirvió en un baño durante 15 min y tras enfriar, se añadió un volumen del reactivo Nelson y 12 volúmenes de agua destilada. Todas las valoraciones se hicieron por triplicado. La absorbancia a 540 nm se convirtió en equivalentes de glucosa utilizando la recta de calibrado obtenida con este azúcar, con una respuesta lineal hasta una concentración de 1 mM:

$$A_{540} = 0,6636 c - 0,0193 \quad (R^2 = 0,99)$$

### **2.4.3 VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

Los métodos espectrofotométricos que se exponen a continuación, se usaron para caracterizar las distintas actividades presentes en los complejos enzimáticos utilizados. En todos los casos, se realizaron controles de los reactivos y las enzimas y estos se restaron de los problemas para calcular las actividades enzimáticas. Mientras no se indique lo contrario, la unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para obtener un  $\mu\text{mol}$  de producto en un minuto (Unidades Internacionales).

Las reacciones que se hicieron a temperatura controlada se llevaron a cabo en un termobloque, Termo Shaker TS-100 Biosan, en agitación continua (1200 rpm). El espectrofotómetro utilizado fue un Shimadzu UV-160A. Todas las valoraciones se hicieron por triplicado.

#### **2.4.3.1 Lacasa**

Tal y como se describe en el apartado 1.7, las lacasas son fenoloxidasas (EC 1.10.3.2) que oxidan una gran variedad de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, utilizando  $O_2$  como aceptor final de electrones (Thurston, 1994).

Esta actividad se determinó a temperatura ambiente y en continuo, siguiendo espectrofotométricamente la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP) (Fluka) 5 mM en acetato sódico 100 mM a pH 5. La oxidación del sustrato da lugar a un dímero, la cerulignona, que presenta un máximo de absorbancia a 469 nm. El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{469}$ ) utilizado para calcular la actividad enzimática es  $27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , referido a la oxidación de 2,6-dimetoxifenol.

#### **2.4.3.2 Peroxidasa**

Las peroxidasas ligninolíticas (EC 1.11.1.7) son enzimas que catalizan la oxidación de la lignina y otros compuestos aromáticos tras la activación del hierro de su grupo hemo por el peróxido de hidrógeno (Bao et al., 1994). Existen diferentes tipos de peroxidasas, descrito en el apartado 1.7.

La actividad independiente de  $Mn^{2+}$  se determinó utilizando el mismo sustrato que para la actividad lacasa, pero en presencia de 0,1 mM de  $H_2O_2$ . La actividad dependiente de  $Mn^{2+}$  se determinó también a temperatura ambiente y en continuo, midiendo la formación del complejo  $Mn^{+3}$ -tartrato, a partir de la oxidación de  $MnSO_4$  (Sigma) 0,1 mM, en tartrato sódico 100 mM a pH 5 y en presencia de 0,1 mM  $H_2O_2$  (Paszczyński et al., 1988). El coeficiente de extinción del complejo  $Mn^{+3}$ -tartrato a 238 nm es  $6500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### **2.4.3.3 Proteasa**

La valoración de la actividad proteasa (EC 3.4) se llevó a cabo valorando espectrofotométricamente la hidrólisis de azocaseína a grupo azo y aminoácidos libres y se cuantificó midiendo el cambio en la absorbancia de la muestra una vez finalizada la reacción (Böckle et al., 1999). La unidad de actividad proteasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 440 nm por minuto y mL.

Las determinaciones se realizaron a 30 °C usando una solución del 0,25% de azocaseína (Serva) en tampón fosfato 50 mM pH 6 y diferentes diluciones de la enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min) hasta conseguir valores lineales de absorbancia. Tras la incubación, se añadieron 100 µL de ácido tricloroacético 100% a 1 mL de la mezcla de reacción. La adición del ácido provoca la precipitación del sustrato y se detiene la reacción. Tras centrifugar la mezcla de reacción 5 min (Centrifuge 5415C, Eppendorf) se midió el cambio de absorbancia a 440 nm.

#### **2.4.3.4 Actividades implicadas en la degradación de almidón**

Como se ha comentado en la Introducción (apartado 1.5.1.1), el almidón de cereales está formado por moléculas de amilosa y amilopectina. Las actividades valoradas en este trabajo se describen a continuación:

##### **α-Amilasa**

Las α-(1,4)-D-glucan-glucanohidrolasas, conocidas como α-amilasas (EC 3.2.1.1), son enzimas que hidrolizan arbitrariamente polisacáridos que contengan tres o más unidades de glucosa unidas mediante enlaces α-(1,4)-glicosídicos, como el glucógeno o el almidón. En este último caso, dan lugar a maltotriosa y maltosa desde la amilosa, liberando maltosa, glucosa y dextrinas desde la amilopectina.

Para la valoración de esta actividad se usó como sustrato una solución del 0,1% de almidón soluble (Calbiochem) en tampón acetato sódico 50 mM pH 5. La mezcla de reacción contenía 100 µL de complejo enzimático diluido y 900 µL de sustrato. La actividad se valoró a 50 °C, utilizando diferentes diluciones de enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min), hasta conseguir valores lineales de actividad. Tras la incubación, los azúcares reductores liberados se determinaron por el método de Somogyi y Nelson (apartado 2.4.2).

##### **Glucoamilasa**

Estas enzimas son exo-α-(1,4)-glucosidasas (EC 3.2.1.3) que hidrolizan los enlaces α-(1,4) y α-(1,6) del almidón (tanto amilosa como amilopectina), desde los extremos no reductores, dando lugar a unidades de glucosa y pequeñas cantidades de oligosacáridos y dextrinas. La

actividad se valoró usando el sustrato sintético *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido ( $\alpha$ -*p*NPG). La enzima hidroliza el enlace éster, liberando *p*-nitrofenol (*p*NP) que se cuantifica espectrofotométricamente.

La reacción se realizó utilizando una solución al 0,1% de  $\alpha$ -*p*NPG (Sigma) en tampón acetato sódico 50 mM pH 5. La mezcla de reacción se preparó con 100  $\mu$ L de complejo enzimático diluido y 100  $\mu$ L de sustrato. La actividad se valoró a 50 °C, utilizando diferentes diluciones de enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min), hasta conseguir valores lineales de actividad. Para finalizar la reacción, se añadieron a la mezcla 500  $\mu$ L de carbonato sódico al 2% en agua destilada. A continuación, se midió la liberación de *p*NP ( $\epsilon_{410}$ = 15200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), a 410 nm.

#### **2.4.3.5 Actividades implicadas en la degradación de hemicelulosas**

En el apartado 1.6.1.2, se describe detalladamente la estructura de este polisacárido. En este trabajo se han valorado las enzimas mayoritarias implicadas en el proceso de degradación de xilanos, polisacárido mayoritario en las hemicelulosas de las paredes celulares de trigo y cebada, materiales utilizados en España para producir etanol 1G.

##### **$\beta$ -Xilosidasa**

Las exo- $\beta$ -(1,4)-xilosidasas (EC 3.2.1.37) actúan sobre xilobiosa y xilooligosacáridos, de cadena corta y no sustituidos, hidrolizando los enlaces  $\beta$ -(1,4) y liberando así residuos de D-xilosa a partir del extremo no reductor de estos sustratos (Reilly P.J., 1981). La actividad se determinó con *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido (*p*NPX), que al hidrolizarse libera xilosa y *p*NP.

Se preparó una solución del 0,1% de *p*NPX (Sigma) en tampón acetato sódico 50 mM pH 5. La actividad se valoró a 50 °C, utilizando diferentes diluciones de enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min), hasta conseguir valores lineales de actividad. La mezcla de reacción se preparó con 100  $\mu$ L de complejo enzimático diluido y 100  $\mu$ L de sustrato. Tras la incubación, la reacción se para con carbonato sódico y la liberación de *p*NP se midió a 410 nm, utilizando los blancos correspondientes.

### **Xilanasa**

Generalmente reciben este nombre las enzimas endo- $\beta$ -(1,4)-xilanasas (EC 3.2.1.8) que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos  $\beta$ -(1,4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños (Biely et al., 1985).

Esta actividad se valoró usando una solución del 0,5% de xilano (xilano de abedul, Sigma) en tampón acetato sódico 50 mM pH 5. La mezcla de reacción contenía 500  $\mu$ L de complejo enzimático diluido y 500  $\mu$ L de sustrato. La actividad se valoró a 50 °C, utilizando diferentes diluciones de enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min) hasta conseguir valores lineales de actividad. Tras la incubación se midieron los azúcares reductores liberados en el sobrenadante por el método de Somogyi y Nelson (apartado 2.4.2).

#### **2.4.3.6 Actividades implicadas en la degradación de celulosa**

Debido a la naturaleza compleja de la celulosa (apartado 1.6.1.1), para degradar este polisacárido es necesaria la acción secuencial de distintas enzimas, con diferentes actividades catalíticas (Lee, 1997). Las enzimas mayoritarias de este sistema incluyen endo- $\beta$ -(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.4), exo- $\beta$ -(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) (Wood y Bhat, 1988).

### **Endoglucanasa**

Estas enzimas,  $\beta$ -(1,4)-D-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), hidrolizan al azar los enlaces  $\beta$ -(1,4)-glicosídicos de las moléculas de celulosa dando lugar a oligosacáridos de pequeño tamaño. La actividad se valoró utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. Este éter de metil celulosa se obtiene por reacción de la celulosa en medio básico con el ácido monocloroacético (Togrul y Arslan, 2003).

La actividad se valoró a 50 °C, usando una solución del 2% de CMC (Sigma) en tampón acetato sódico 50 mM pH 5 y diferentes diluciones de enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min) hasta conseguir valores lineales de actividad. Finalizado el tiempo de incubación, se toman 200  $\mu$ L de muestra y se determinaron las sustancias reductoras liberadas mediante el método de Somogyi y Nelson. Al añadir el reactivo de Nelson en la reacción se genera un precipitado, por lo que fue necesario

centrifugar (5 min a 3000 rpm) antes de determinar la absorbancia del sobrenadante a 540 nm.

### **$\beta$ -Glucosidasa**

Estas enzimas,  $\beta$ -D-glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), son responsables de la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -glucosídicos tanto de dímeros de glucosa (celobiosa), como de aril- $\beta$ -glucósidos. Se valoraron utilizando el sustrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido ( $\beta$ -*p*NPG) que posee una estructura y un enlace intramolecular similar al glucósido  $\beta$ -(1,4) de su sustrato natural, la celobiosa, y en la reacción se libera glucosa y *p*NP (Messner y Kubicek, 1990).

La actividad se valoró a 50 °C usando una solución del 0,1% de  $\beta$ -*p*NPG (Sigma) en tampón acetato sódico 50 mM pH 5, utilizando diferentes diluciones de enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min) hasta conseguir valores lineales de actividad. La mezcla de reacción se preparó con 100  $\mu$ L de complejo enzimático diluido y 100  $\mu$ L de sustrato, determinando la liberación de *p*NP, de manera similar a las descritas para la glucoamilasa y  $\beta$ -xilosidasa.

### **Avicelasa o Celulasa Total**

La actividad exocelulasa, se valoró indirectamente determinando la actividad avicelasa, que mide la acción de las diferentes enzimas del complejo celulolítico (exo y endo celulasas y  $\beta$ -glucosidasa) sobre avicel o celulosa microcristalina (Henrissat et al., 1985).

La actividad se valoró a 50 °C usando una solución al 0,1% de avicel (Sigma) en tampón acetato sódico 50 mM pH 5, utilizando diferentes diluciones de enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min), hasta conseguir valores lineales de actividad. La mezcla de reacción contenía 200  $\mu$ L de complejo enzimático diluido y 800  $\mu$ L de sustrato. Finalizado el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó para retirar el avicel en suspensión y se determinaron las sustancias reductoras liberadas mediante el método de Somogyi y Nelson (apartado 2.4.2).

#### **2.4.3.7 Actividad sobre $\beta$ -(1,3)-glucanos de la pared celular vegetal**

Existen también en la pared celular vegetal otros polisacáridos en menores proporciones formados por cadenas de glucosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -(1,3)-glucosídicos.

#### **Endo $\beta$ -(1,3)-glucanasa**

Las  $\beta$ -(1,3)-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.39) hidrolizan los enlaces  $\beta$ -(1,3)-glicosídicos de laminarina y otros polisacáridos con este tipo de enlace, dando lugar a oligosacáridos de pequeño tamaño.

La actividad se valoró a 50 °C usando una solución al 0,1% de laminarina (Sigma), sustrato lineal de  $\beta$ -(1,3)-glucano, en tampón acetato sódico 50 mM pH 5 y utilizando diferentes diluciones de enzima y tiempos de incubación (5, 10 y 15 min) hasta conseguir valores lineales de actividad. La mezcla de reacción se preparó con 100  $\mu$ L de complejo enzimático diluido y 900  $\mu$ L de sustrato. Los azúcares liberados tras el tiempo de incubación con la enzima se valoraron por el método de Somogyi y Nelson (apartado 2.4.2).

#### **2.4.4 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE COMPLEJOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES**

Para la posible mejora de la producción de etanol 1G a partir de grano de cereal, así como para optimizar los procesos de etanol 2G, se realizó en este trabajo la caracterización parcial de nueve complejos comerciales (**Tabla 2.4**) determinando, además de las diferentes actividades presentes en los complejos, su pH óptimo y estudios de estas actividades frente a temperatura, así como su estabilidad frente a estos parámetros. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

**Tabla 2.4.** Complejos enzimáticos caracterizados, suministrados por Novozymes®.

<b>Nombre comercial</b>	<b>Complejo enzimático</b>	<b>Actividad descrita</b>
Alcalase 2,5 L	1	Proteasa
Liquozyme SC DS	2	$\alpha$ -amilasa
Spirizyme Fuel	3	Glucoamilasa
Viscozyme Barley	4	Amilasa / Celulasa
Viscozyme Wheat	5	Xilanasa / Endoglucanasa
Ultraflo L	6	Endoglucanasa
Viscozyme Rye	7	Xilanasa / Endoglucanasa
Celluclast 1,5 L FG	8	Celulasa
Novozym 50010	9	$\beta$ -glucosidasa

- ♦ **pH óptimo:** se determinó el pH en el que cada actividad enzimática era máxima en los complejos enzimáticos de la **Tabla 2.4**. Para ello, se incubaron los complejos con los distintos sustratos en tampón CFB 100 mM, en un rango de pH de 3 a 8, a temperatura ambiente. Las distintas actividades enzimáticas se valoraron siguiendo las indicaciones descritas a lo largo del apartado 2.4.3.
- ♦ **Estudios de la actividad frente a temperatura:** se determinó la temperatura a la que cada actividad enzimática era máxima en los complejos enzimáticos de la **Tabla 2.4**. Para ello, se valoraron las distintas actividades enzimáticas siguiendo las indicaciones descritas a lo largo del apartado 2.4.3, incubando la mezcla de reacción a temperaturas de 50, 60 y 70 °C.
- ♦ **Estabilidad frente a pH:** se determinó la estabilidad de los complejos enzimáticos, **Tabla 2.4**, durante 48 h de incubación a



temperatura ambiente en tampón CFB 100 mM, en un rango de pH de 3 a 8.

- ♦ **Estabilidad frente a temperatura:** se determinó la estabilidad de los complejos enzimáticos, **Tabla 2.4**, durante 48 h de incubación a 50, 60 y 70 °C en tampón acetato 50 mM pH 5.

## **2.5 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE TRIGO Y CEBADA**

Estos análisis se realizaron para conocer la composición química de los granos de trigo y cebada, materias primas utilizadas en la actualidad para la obtención de bioetanol en España. Todas las valoraciones se hicieron por triplicado.

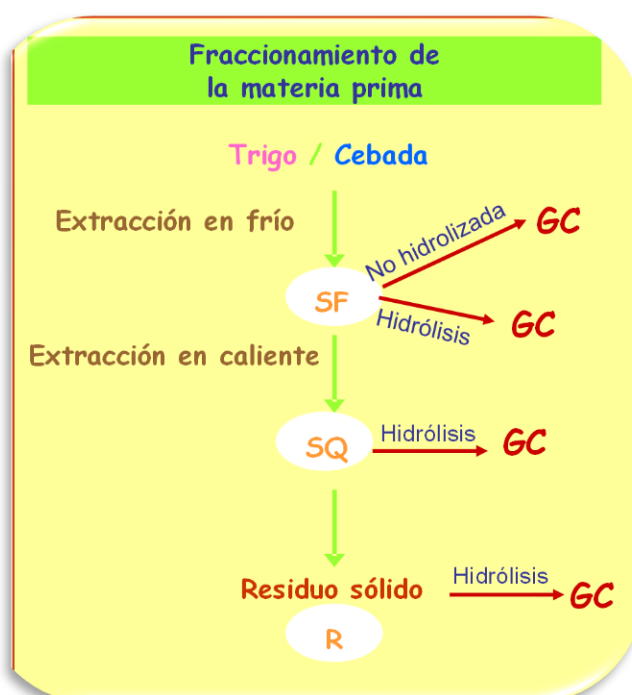
### **2.5.1 FRACCIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA**

Una vez obtenida la harina integral, no refinada, de ambos cereales se realizaron extracciones secuenciales con agua fría y caliente para analizar por cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) su composición en azúcares solubles y, tras hidrolizar, los que formaban parte de los polisacáridos.

El procedimiento seguido fue el mismo para las dos materias primas (**Fig. 2.3**): se pesaron 4 g de las harinas en botes de centrífuga de 250 mL y se añadieron 50 mL de agua destilada a temperatura ambiente, dejándolos en continua agitación en una placa agitadora durante 24 h. Pasado este tiempo, se centrifugaron durante 3 h (centrífuga Sorvall RC 5C PLUS con un rotor SLA 1500) a 13000 rpm y 4 °C. A continuación, se recogieron los sobrenadantes y se repitió la extracción de los residuos con agua a temperatura ambiente para asegurar en la medida de lo posible la total extracción de los azúcares solubles. Se juntaron los sobrenadantes, se concentraron en rotavapor (hasta un volumen final de aproximadamente 20 mL) y por último se liofilizaron. Esta fracción, **soluble en agua fría**, se denominó **SF**, y se guardó a temperatura ambiente hasta su utilización.

A los residuos de trigo y cebada de la extracción anterior se añadieron 50 mL de agua agitando durante 24 h. Posteriormente se realizó una extracción en autoclave a 110 °C durante 30 min. El proceso se repitió una segunda vez, para extraer la mayor cantidad posible de polisacáridos e inmediatamente se agitó y filtró en caliente para evitar la precipitación del almidón, componente mayoritario en ambas harinas, mediante un filtro de malla metálica de 0,6 mm. El material soluble en agua caliente, se concentró en rotavapor hasta un volumen final de aproximadamente 10 mL y se liofilizó. Esta fracción, **soluble en agua caliente**, se denominó **SQ**.

Finalmente, se tomaron los residuos insolubles en agua y se liofilizaron. Esta fracción, correspondiente al **residuo sólido** final, se denominó **R**.



**Fig. 2.3.** Esquema del fraccionamiento de la materia prima realizado en el laboratorio.

## 2.5.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Mediante esta técnica se determinó la configuración anomérica predominante ( $\alpha$  o  $\beta$ ) de los polisacáridos y se chequeó la presencia de proteínas o sustituyentes tipo carboxilo, acetamida o sulfato, que muestran bandas de absorción características en el infrarrojo (Barker y Walker, 1980).

Aproximadamente 1 mg de muestra finamente pulverizada se mezcló en un mortero con 300 mg de KBr. Una vez homogeneizado el material, se preparó una pastilla utilizando una prensa Perkin-Elmer. Los espectros se registraron en un espectrofotómetro FTIR 4200 tipo A Jasco Corporation, en el rango de  $700\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ . El detector empleado fue del tipo TGS con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.5.3 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS TOTALES**

En presencia de ácido sulfúrico concentrado, se deshidratan los azúcares con grupos reductores, aldehído o cetona, dando lugar a derivados del furfural que se condensan con los fenoles, generando complejos coloreados naranja-amarillento que se pueden cuantificar espectrofotométricamente (Dubois et al., 1956).

Se prepararon disoluciones (1 mg/mL) de las muestras de harina de trigo y cebada, hidrolizadas previamente con 250  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico al 72%, a una temperatura de 80 °C durante 15 min para lograr una buena disolución de los componentes. Para el análisis de carbohidratos totales se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de las respectivas disoluciones, 125  $\mu\text{L}$  de fenol al 5% en agua y 625  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. A continuación se agitó, se leyó la absorbancia a 485 nm frente a un blanco con agua y se calculó la concentración de azúcares en las muestras con respecto a una recta patrón de glucosa realizada para cada determinación. La respuesta es lineal en muestras que contienen entre 5 y 80  $\mu\text{g}$  de azúcar.

### **2.5.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS**

Se valoró el contenido proteico de la harina y sus fracciones utilizando el método de Bradford, según se indica en el apartado 2.4.1.

Para solubilizar las proteínas, en el caso de las harinas de trigo y cebada y sus respectivas fracciones (apartado 2.5.1), se pesaron 10 mg de las muestras y se añadió 1 mL de NaOH 1M durante 16 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron, se tomó el sobrenadante, y se diluyó con agua destilada hasta una concentración adecuada para la cuantificación de proteínas. Como control negativo se usó una solución de almidón comercial (1 mg/mL).

### **2.5.5 DETERMINACIÓN DE LIGNINA KLASON**

Según indica la norma Tappi 222 om-88, los polisacáridos de los granos de cereal se hidrolizan totalmente con ácido sulfúrico, precipitando la lignina Klason o lignina ácido-insoluble. Este método permite determinar la lignina ácido-insoluble gravimétricamente, tras filtración. Según esta norma, solo un pequeño porcentaje de la lignina de gramíneas es soluble en ácido.

Se depositaron 300 mg de cada una de las harinas en frascos Pyrex a los que se añadieron 3 mL de ácido sulfúrico al 72%, y se mantuvieron en un baño agitador (Julabo SW22) a 30 °C y 140 rpm, durante 1 h y tratando de homogeneizar la mezcla cada 15 min, con ayuda de una varilla de vidrio. Pasado este tiempo, se añadieron 84 mL de agua destilada a la mezcla para alcanzar una concentración de ácido sulfúrico del 4% y se autoclavó a 110 °C durante 1 h. Una vez finalizado el proceso de autoclavado, se dejó enfriar y se procedió a la filtración del hidrolizado. Esta se realizó utilizando placas de vidrio poroso, previamente taradas tras mantenerlas previamente 4 h a 100 °C. Estas placas porosas se adaptaron a un Kitasato, conectado a su vez a una bomba de vacío, para recoger la lignina y lavar el residuo con agua destilada para eliminar completamente el ácido (hasta pH neutro). El filtro con el residuo se secó a 100 °C durante 4 h, estimándose el contenido de lignina por diferencia de peso.

### **2.5.6 ANÁLISIS DE AZÚCARES**

Se determinó la composición en monosacáridos libres de las harinas en la fracción SF. Dichos monosacáridos se analizaron por GC, tras un proceso de derivatización para convertirlos en compuestos volátiles.

La composición de los polisacáridos de las diferentes fracciones se analizó mediante hidrólisis ácida y derivatización de los monosacáridos liberados en la hidrólisis. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

### **Hidrólisis**

Los polisacáridos de las distintas fracciones (5-10 mg) se hidrolizaron durante 1 h a 120 °C con 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA), utilizando diferentes concentraciones según el origen de las fracciones: i) la harina y las fracciones SF y SQ se hidrolizaron dos veces consecutivamente con TFA 5 M y ii) el residuo (R) se hidrolizó con TFA 1,5 M y seguidamente con TFA 5 M. Se realizó este tipo de hidrólisis con la finalidad de conseguir el máximo porcentaje de monosacáridos, evitando a su vez la degradación de los componentes más lábiles por el uso de concentraciones altas de TFA.

### **Derivatización**

La derivatización de los monosacáridos se realizó mediante su conversión en sus correspondientes acetatos de alditol (Laine et al., 1972). Este método presenta la ventaja de producir un único derivado de cada monosacárido dando lugar a cromatogramas simples. En todos los casos se añadió, tras la hidrólisis, 1 mg de inositol como patrón interno para el análisis cuantitativo por GC.

En las muestras hidrolizadas con TFA, se procedió primero a la eliminación del ácido por evaporación, hasta sequedad, en rotavapor. A continuación, se redujeron los monosacáridos liberados con NaBH<sub>4</sub> en 1 mL de agua a temperatura ambiente durante 12 h. Luego se destruyó el exceso de borohidruro por adición de HCl concentrado hasta pH ácido y se evaporó en rotavapor a 70 °C. Para eliminar las sales de boro formadas, se lavó con 2 mL de metanol, repitiendo dicho lavado tres veces.

Los alditoles se acetilaron con 500 µL de piridina-anhídrido acético (1:1), durante 1 h en estufa a 100 °C. Por último, se evaporaron las muestras a sequedad, utilizando un rotavapor a 80 °C (colocado en una campana de extracción para evitar los vapores de piridina).

### **Cromatografía de gases**

Los azúcares neutros fueron identificados y cuantificados mediante GC. En el momento de analizar las muestras se disolvieron en 200 µL de cloroformo y se tomó una alícuota de 1 µL, que fue inyectada en el cromatógrafo. Se empleó un equipo de la casa Perkin-Elmer (modelo

Autosystem), con detector de ionización de llama, inyector split/splitless y helio a una presión de 30 psi como gas portador. El inyector y el detector se programaron a una temperatura de 250 °C. Los distintos componentes de la muestra se separaron en una columna capilar de sílice fundida TR100-CN (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm espesor de la película), utilizando un programa de temperaturas que comenzó isotérmicamente a 210 °C, se mantuvo durante 2 min y luego subió a razón de 15 °C/min hasta los 240 °C, manteniéndose finalmente 7 min a esa temperatura. El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con los de patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta obtenidos con diferentes monosacáridos que se utilizaron como patrón.

### **2.5.7 TIPOS DE ENLACE EN LOS POLISACÁRIDOS**

La introducción de grupos funcionales en los -OH libres, antes y después de la hidrólisis de un polisacárido, permite identificar los -OH implicados en las uniones entre los diferentes monosacáridos y, por tanto, el tipo de enlace entre ellos.

#### **Metilación**

La introducción de grupos metilo en los -OH libres de los azúcares de los polisacáridos depende del grado de ionización de los grupos hidroxilo libres. Por esto, es esencial efectuar la reacción en un medio básico con el fin de conseguir que dichos grupos hidroxilo se transformen en alcóxilos. Existen varios métodos de metilación, y en este trabajo se utilizó el método de Ciucanu y Kerek, modificado por Needs y Selvendran (1993).

Las fracciones SF, SQ y R, tanto de trigo como cebada (3 mg), se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando un baño de ultrasonidos. A las muestras se añadieron 100 mg de hidróxido sódico y la mezcla se sonicó durante 1 h. A continuación se enfriaron los tubos y se añadió 1 mL de yoduro de metilo, volviéndose a sonicar la mezcla durante 2 h. Los productos de la reacción, recogidos con 2 mL de cloroformo-metanol (1:1), se dializaron frente a agua destilada durante

48 h, posteriormente frente a etanol-agua (1:1) durante 36 h y finalmente, se evaporaron a sequedad en rotavapor.

En este punto, las muestras se hidrolizaron para obtener azúcares parcialmente metilados, que se redujeron a sus correspondientes acetatos de alditol. La reducción y acetilación se realizó según el método de Laine (1972), previamente descrito. La única modificación consistió en reducir con borohidruro sódico deuterado ( $\text{NaBD}_4$ ), introduciendo con ello un marcaje de masa en el carbono 1.

### **Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (GC-MS)**

La permetilación de polisacáridos, seguida de la separación de los derivados por cromatografía de gases e identificación por espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS), se utilizó también para confirmar y completar el análisis de los carbohidratos realizado por GC.

Los acetatos de alditol parcialmente metilados se analizaron mediante GC-MS en un sistema de Agilent (modelo 7980A-5975C), con una columna capilar de sílice fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm; espesor de la película 0,25  $\mu\text{m}$ ), con helio como gas portador. Se utilizó un programa de temperaturas que comenzaba en 160 °C durante 1 min para luego subir, a razón de 2 °C/min, hasta 210 °C. Inyector y detector se programaron a 250 °C. La ionización se llevó a cabo por impacto electrónico. De los fragmentos obtenidos en el espectro de masas se puede deducir el tipo de sustitución de los monómeros en la mayoría de los casos. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos en los cromatogramas obtenidos por GC-MS.

### **2.5.8 ANÁLISIS DE ÁCIDOS URÓNICOS**

Con la finalidad de analizar el contenido en ácidos urónicos de las harinas se utilizó la técnica de metanolisis, que despolimeriza los polisacáridos y convierte los monosacáridos liberados en sus correspondientes metil-glicósidos. Estos compuestos, no volátiles, deben sufrir una derivatización posterior para poder ser analizados por GC-MS. Esta técnica tiene como ventaja la identificación simultánea de azúcares neutros, aminoazúcares y ácidos urónicos, pero el inconveniente que

cada monosacárido presente en la muestra origina múltiples picos, dando lugar a cromatogramas más complicados.

### **Metanolisis**

Se pesaron 2 mg de las muestras a analizar y se añadió 1 mL de metanol-clorhídrico 3 M, dejando la reacción durante 16 h a 80 °C en viales herméticamente cerrados. A continuación, se secó en rotavapor a 70 °C y se lavó con 750 µL de metanol, volviéndose a llevar a sequedad en rotavapor en las mismas condiciones.

### **Derivatización**

La derivatización se realizó con bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) que introduce grupos trimetilsililo en los -OH libres haciendo volátiles los compuestos y permitiendo su identificación por GC-MS (Gierer y Norén, 1980; Lapierre et al., 1989).

A continuación, se añadieron 200 µL de BSTFA y 200 µL de piridina, incubando la mezcla a 80 °C durante 30 min en tubos herméticamente cerrados. Finalmente, las muestras derivatizadas se analizaron por GC-MS.

### **Cromatografía de gases-Espectrometría de masas**

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo GC-MS 7980A-5975C, se usó una columna de sílice fundida HP-5MS (30m x 0,25 mm, 0,2 µm espesor de la película). El gas portador fue helio a una presión de 10 psi. El inyector se programó a una temperatura de 300 °C, con una relación de split 50:1. Los distintos componentes de la muestra se separaron mediante un programa de temperaturas que comienza isotérmicamente a 150 °C (1 min), para luego ascender a razón de 4 °C/min hasta los 220 °C. La identificación se realizó atendiendo a los espectros de masas y a los tiempos de retención de patrones analizados en idénticas condiciones.



## **2.6 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE HARINA DE TRIGO**

Para optimizar la producción industrial de bioetanol a partir de harina de trigo, se realizaron tratamientos enzimáticos secuenciales, siguiendo las etapas descritas en el proceso de producción industrial (apartado 1.5.3): Mezcla, Licuefacción, Sacarificación y Fermentación.

La harina de trigo (2 g) se repartió en tubos de centrífuga de 25 mL. Esta harina se mezcló con agua destilada (3:1), consiguiendo un porcentaje de sólidos en torno al 20-30% y un pH constante entre 5 y 6. Seguidamente, las muestras se mantuvieron en un baño con agitación a 60 °C y 90 rpm durante 40 min. Una vez homogeneizada la materia prima, se añadieron los distintos cócteles comerciales, seleccionados en base a las actividades enzimáticas más adecuadas para realizar los tratamientos. Cada ensayo se realizó por triplicado y con un control, procesado de igual manera que las muestras, pero añadiendo agua destilada en lugar del complejo enzimático correspondiente. Las dosis enzimáticas empleadas en cada etapa de tratamiento, se encuentran en el rango de las utilizadas por las empresas del sector en la producción de bioetanol.

Tras cada uno de los tratamientos, se separaron mediante centrifugación (centrífuga Sorvall RC 5C PLUS con un rotor SLA 1500, 13000 rpm y 20 °C durante 30 min) las fracciones sólidas (x-SOLID) de las líquidas (x-LIQ) y se analizaron por separado. La nomenclatura usada concierne a las etapas del proceso que se estén analizando en cada momento.

En primer lugar, se determinó el contenido en SR en la fracción líquida mediante el método de Somogy y Nelson (apartado 2.4.2), y a continuación se realizaron distintos análisis en ambas fracciones.

Para dichos análisis, las dos fracciones obtenidas se liofilizaron y se trabajó con ellas siguiendo el esquema detallado a continuación:

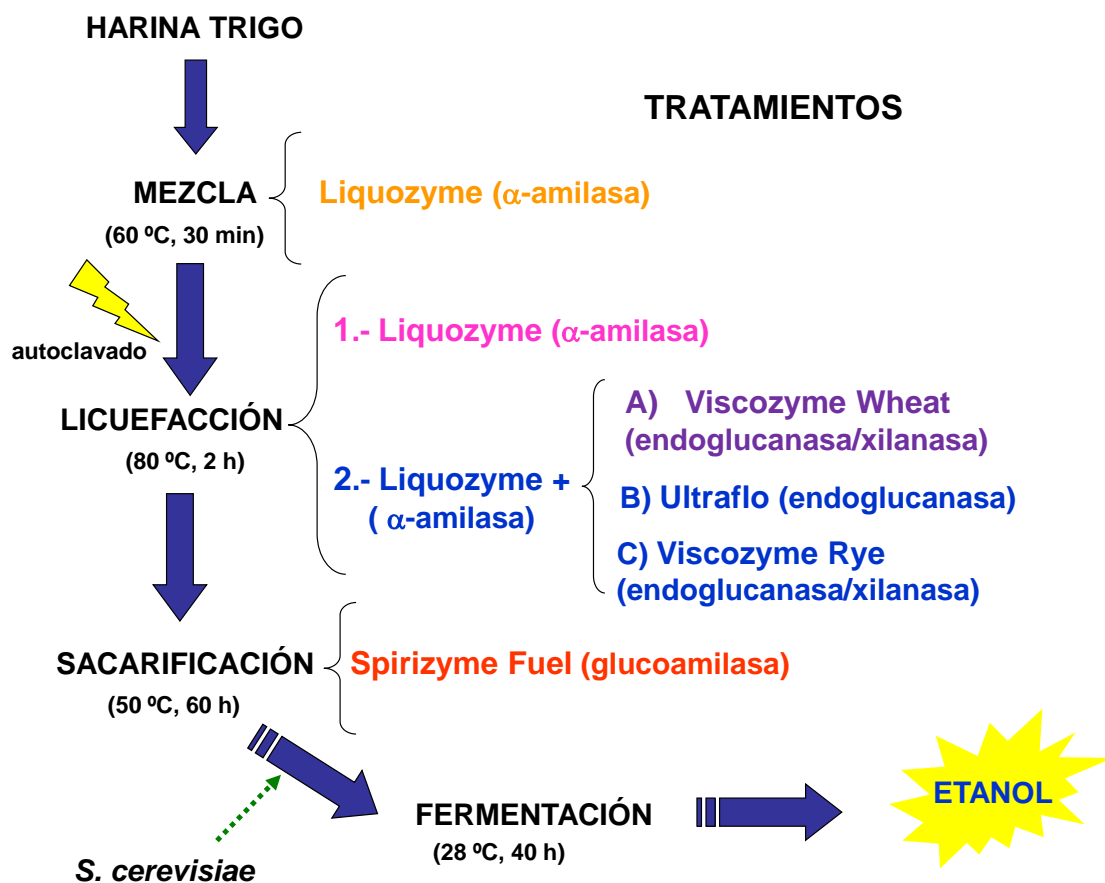
**\* Fracción Sólida (x-SOLID):**

- 1.- Peso seco tras liofilización.
- 2.- Hidrólisis (TFA 3 M) y análisis de oligo- y polisacáridos.

\* Fracción Líquida (x-LIQ):

- 1.- Peso seco tras liofilización.
- 2.- Hidrólisis (TFA 3 M) y análisis de oligo- y polisacáridos.
- 3.- Análisis de monosacáridos libres: denominada fracción Líquida No Hidrolizada (x-LIQ-NH).

Los monosacáridos libres y los resultantes de la hidrólisis de oligo- y polisacáridos de las fracciones líquida y sólida se analizaron por GC, tal y como se describe en el apartado 2.5.6. En la **Figura 2.4**, se muestra un esquema general del proceso realizado en el laboratorio para la producción de bioetanol, indicando en cada paso las distintas enzimas o las mezclas utilizadas. En los siguientes apartados se detallan las condiciones para cada tratamiento.



**Fig. 2.4.** Esquema del proceso realizado en el laboratorio, siguiendo las etapas del proceso industrial e indicando los diferentes cócteles utilizados en cada caso para tratar de optimizar la producción de bioetanol.

### 2.6.1 ETAPA DE MEZCLA

En esta etapa se añaden  $\alpha$ -amilasas, que hidrolizan al azar los enlaces  $\alpha$ -(1,4) de la amilosa y amilopectina, dando lugar a polisacáridos de distinta longitud de cadena, dextrinas, maltotriosas y maltosa.

La harina de trigo se procesó, como se indica en el apartado anterior, antes de añadir las diferentes dosis del **cóctel 2, Liquozyme**, con actividad  **$\alpha$ -amilasa**. En una primera selección, las dosis de enzimas ensayadas para optimizar el proceso fueron las comprendidas entre 0,00625 y 0,125 mg/g de harina. Todos los tratamientos se realizaron en un baño a 60 °C, durante 30 min y 90 rpm. Con el fin de analizar el efecto de las diferentes dosis de enzimas, se separaron, mediante centrifugación (13000 rpm durante 30 min) dos fracciones: una líquida, mezcla líquida (m-LIQ) y otra sólida, mezcla sólida (m-SOLID), realizándose los análisis descritos en el apartado 2.6.

Tras la realización de dichos análisis en las distintas fracciones, la concentración de enzima seleccionada para optimizar la etapa de Licuefacción fue 0,079 mg/g harina del cóctel.

### 2.6.2 ETAPA DE LICUEFACCIÓN

En el laboratorio, la etapa de Mezcla se realizó utilizando Liquozyme (0,079 mg/g harina) y el mosto obtenido se autoclavó (110 °C, 1 atm durante 30 min), con la intención de alterar la estructura de los gránulos de almidón (supliendo la etapa de presión y descompresión que se realiza en el proceso industrial). Después las muestras se homogeneizaron en un baño a 80 °C durante 1 h a 90 rpm, y se añadieron los diferentes cócteles enzimáticos de varias maneras, para seleccionar el sistema más adecuado.

#### 1.-Adición de $\alpha$ -amilasa

A la fracción autoclavada y homogeneizada se añadieron diferentes dosis del **cóctel 2, Liquozyme**, con actividad  **$\alpha$ -amilasa**. El rango utilizado fue de 0,125 a 0,225 mg/g harina y los tratamientos se incubaron durante 2 h a 80 °C y 90 rpm. Finalizado el proceso, se separaron mediante centrifugación (13000 rpm durante 30 min) dos fracciones en la etapa de Licuefacción (Lic): líquida con cóctel 2 (Lic-2-LIQ) y sólida (Lic-2-SOLID).

Como en la etapa de Mezcla, en la fracción líquida se determinaron inicialmente las SR mediante el método de Somogy y Nelson, para posteriormente con las fracciones liofilizadas tanto líquida como sólida realizar las distintas determinaciones de peso y azúcares mediante GC (apartado 2.6).

## **2.- Adición simultánea de $\alpha$ -amilasa y endoglucanasa/xilanasa**

En este caso se estudió el efecto combinado de las dosis anteriormente valoradas con  $\alpha$ -amilasa correspondiente al **cóctel 2, Liquozyme**, (0,125 a 0,225 mg/g harina) y una dosis fija (0,149 mg/g harina) de la **actividad endoglucanasa/xilanasa**, presente en el **cóctel 5, Viscozyme Wheat**. Las condiciones del proceso y tiempos de incubación fueron las mismas que en el ensayo anterior.

A continuación, se separaron mediante centrifugación las dos fracciones líquida y sólida tratadas con los cócteles 2 y 5 (Lic-2+5-LIQ y Lic-2+5-SOLID, respectivamente), donde se analizaron también las SR y los monosacáridos libres y totales, que forman parte de los oligo- y polisacáridos de las fracción líquida y sólida (de la misma manera que en el apartado anterior).

## **3.- Adición simultánea del cóctel $\alpha$ -amilasa y otros cócteles con actividades endoglucanasa/xilanasa**

En este último ensayo, se utilizó el **cóctel 2, Liquozyme**, (0,198 mg/g harina) con **actividad  $\alpha$ -amilasa** y otros dos cócteles: i) **cóctel 6, Ultraflo**, con **actividad endoglucanasa** y ii) **cóctel 7, Viscozyme Rye**, con **actividad endoglucanasa/xilanasa** como posible alternativa al uso del **cóctel 5, Viscozyme Wheat**, también con **actividad endoglucanasa/xilanasa**.

Los ensayos con los complejos Ultraflo y Viscozyme Rye se realizaron con dos dosificaciones distintas: i) en función de la cantidad de proteína (mg/g harina) y ii) en función de la actividad endoglucanasa (U/mg harina). En ambos casos, los cálculos se hicieron tomando como comparativa la cantidad de proteína (0,149 mg/g harina) y la actividad endoglucanasa (2,5 U/ g harina) del cóctel 5, Viscozyme Wheat.

El procedimiento fue el mismo que el descrito en apartados anteriores; mediante centrifugación se separaron las fracciones sólidas y

líquidas, que fueron analizadas de la misma manera que las obtenidas en apartados anteriores (SR, monosacáridos libres y composición monosacarídica).

### **2.6.3 ETAPAS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN**

Aunque actualmente en la industria se tiende al proceso de Sacarificación y Fermentación simultánea (SSF), en el experimento realizado en el laboratorio para producir bioetanol a partir de grano de trigo se analizaron de forma independiente las etapas de Sacarificación y Fermentación.

#### **2.6.3.1 Etapa de Sacarificación**

Esta etapa se realizó tras la licuefacción con los cócteles: 5 Viscozyme Wheat, 6 Ultraflo, y 7 Viscozyme Rye, utilizando 2,5 U de actividad endoglucanasa por g de harina para todos ellos.

Finalizada la etapa de Licuefacción, las muestras se homogeneizaron durante 90 min en un baño a 50 °C y 90 rpm, y se añadió el último complejo enzimático **cóctel 3, Spirizyme Fuel, con actividad glucoamilasa**, con una dosificación de 0,409 mg de proteína/g harina. La reacción se incubó durante 60 h. Una vez finalizada la reacción, se separaron mediante centrifugación (13000 rpm durante 30 min) la fracción líquida y la fracción sólida, denominándolas sacarificación líquida y sólida (Sac-LIQ y Sac-SOLID), que fueron analizadas de la misma manera que las obtenidas en apartados anteriores.

#### **2.6.3.2 Etapa de Fermentación**

Finalizada la etapa de Sacarificación, se tomaron 7 mL de la fracción líquida, donde se encuentran los azúcares libres del grano de cereal (tras las diferentes etapas de hidrólisis) para ser fermentados y se colocaron en viales de 12 mL, previamente esterilizados (**Fig. 2.5**). En estos viales se adicionó, en condiciones asépticas, la levadura *S. cerevisiae*, previamente reconstituida (apartado 2.2.2). Estos viales se cerraron herméticamente con tapones de caucho, convenientemente sellados, y se incubaron a 28 °C, y 150 rpm, durante 40 h. En estas muestras se analizó el etanol producido por la levadura mediante GC (apartado 2.5.6).



**Fig. 2.5.** Viales sellados donde se realiza la fermentación de la glucosa, procedente de la hidrólisis de la harina de trigo, por la levadura *S. cerevisiae*.

## 2.7 TRATAMIENTO DE *SLURRY* DE PAJA DE TRIGO CON LACASA

Para realizar estos experimentos se utilizó paja de trigo tratada mediante *steam explosion* en dos condiciones: i) presencia de vapor de agua y ii) 1% ácido sulfúrico (p/v). La biomasa obtenida, denominada *slurry* agua (vapor de agua) o *slurry* ácido (presencia de  $H_2SO_4$ ), tenía un pH inicial de 3,8 y 1,5 respectivamente.

### 2.7.1 TRATAMIENTOS CON LACASAS FÚNGICAS

Se efectuaron ensayos con la lacasa producida por *C. rigida* (apartado 2.2.1) y con la lacasa comercial de *T. villosa* (Novozymes®).

Los tratamientos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 2,5 g de *slurry* (peso seco) en 50 mL de citrato sódico 0,1 M, a diferentes pH (3, 4 y 5). Las muestras se incubaron durante 6 h, en un agitador orbital a 28 °C y 150 rpm, con 1 U/mL de las lacasas, bien de *C. rigida* o *T. villosa*. Los controles se realizaron en las mismas condiciones, sin enzima.

Para seguir la evolución de la reacción, se tomaron muestras de los tratamientos (200  $\mu$ L) cada hora, se centrifugaron y se analizó su contenido en fenoles libres mediante el método de *Folin-Ciocalteu* (apartado 2.7.3). Transcurridas las 5 h de tratamiento todas las muestras

se llevaron a pH 5 con NaOH 10 M, para evitar que las diferencias encontradas pudieran deberse a la mayor o menor solubilización de los fenoles a los distintos pH. Tras estos experimentos se escogió el pH 5 para realizar los tratamientos y se optimizó la dosis de enzima, utilizando 0,1, 0,25, 0,5, 1,5 y 10 U/mL de la lacasa de *C. rigida*, y la duración de los tratamientos (1-6 h). Las condiciones de los experimentos posteriores se fijaron en 0,5 U/mL de lacasa de *C. rigida* y 2 h de tratamiento.

### 2.7.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA BIOMASA Y FERMENTACIÓN DEL HIDROLIZADO

Para analizar el efecto de la lacasa en la fermentación de la glucosa, procedente de la paja pretratada con *steam explosion*, fue necesario hidrolizar la celulosa de este material utilizando celulasas comerciales. El efecto del tratamiento de la lacasa se analizó sobre el hidrolizado del *slurry*, antes y después de realizar la hidrólisis con las celulasas comerciales. En todos los casos se utilizaron controles de *slurry* tratado en las mismas condiciones pero sin la lacasa.

#### 2.7.2.1 Tratamiento con lacasa del *slurry*

Las muestras de *slurry* (2,5 g), obtenido en vapor de agua o en ácido sulfúrico, se suspendieron en 50 mL de tampón citrato 0,1 M a pH 5, a una concentración final en sólidos del 5% (p/v). Una vez finalizado el tratamiento con la lacasa de *C. rigida*, la fracción líquida (prehidrolizado) se separó mediante centrifugación de la fracción sólida (15 min, 1000 rpm). En el prehidrolizado se valoraron los fenoles libres (apartado anterior), y la fracción sólida se usó como sustrato para los experimentos de hidrólisis enzimática (HE) con celulasas.

La hidrólisis enzimática de la biomasa se realizó en matraces de 250 mL con 50 mL de tampón citrato 0,1 M pH 5 y un 5% (p/v) de la paja de trigo sometida a *steam explosion* (realizada en presencia de vapor de agua o ácido sulfúrico diluido), tratada y sin tratar con lacasa (control). Para la hidrólisis enzimática se usó la celulasa comercial cóctel 8, Celluclast, con alta actividad endo- $\beta$ -(1,4)-glucanasa y  $\beta$ -(1,4)-celobiohidrolasa que necesita ser suplementado con otro cóctel con actividad  $\beta$ -glucosidasa como es el cóctel 9, Novozym 50010. La dosis

enzimática de estos dos cócteles fueron 15 FPU de celulasa y 15 U de  $\beta$ -glucosidasa, respectivamente, por g de sustrato seco pretratado (siguiendo los protocolos de NREL). Los tratamientos se realizaron a 50 °C durante 72 h en agitación continua (150 rpm).

También se realizó el tratamiento con lacasas tras la etapa de hidrólisis enzimática, utilizando las mismas condiciones para el tratamiento (0,5 U/mL, 2 h de tratamiento).

#### 2.7.2.2 Efecto del tratamiento del *slurry* con la lacasa sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* y la producción de etanol

La fracción sólida que queda tras separar el prehidrolizado, en la que se encuentra la celulosa, se utilizó para analizar el efecto del tratamiento con lacasas sobre el crecimiento de las levaduras. Para esto, estas fracciones se resuspendieron en un volumen equivalente al inicial de los tratamientos (5% p/v) con buffer salino estéril (1% NaCl) y se inocularon con la levadura *S. cerevisiae* (apartado 2.2.2). Tras realizar las diluciones correspondientes, se tomaron alícuotas del hidrolizado, a diferentes tiempos de fermentación (24, 48 y 72 h), se sembraron en placas Petri con un medio para levaduras (**Tabla 2.5**), se incubaron durante 2 días a 28 °C y se contaron las unidades formadoras de colonias que habían crecido (UFC/mL). Los controles se realizaron en las mismas condiciones sin el tratamiento con lacasa.

**Tabla 2.5.** Composición del medio.

Componentes	g/L
Extracto de malta	0,3
Extracto de levadura	0,3
Peptona	0,5
Agar	2



Con el fin de evaluar el efecto de la lacasa en la producción de etanol, el hidrolizado (7 mL de la fase líquida) se colocó en viales de 12 mL, estos se sellaron y se fermentó con *S. cerevisiae* (apartado 2.2.2). El contenido de los viales, incubados a diferentes tiempos de incubación, se centrifugó (15 min, 4000 rpm) y los sobrenadantes se usaron para analizar fenoles (apartado 2.7.3), azúcares reductores (apartado 2.4.2) y contenido en etanol (apartado 2.7.5).

### 2.7.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO

El contenido fenólico se analizó tanto en el líquido de prehidrolizado como en el sobrenadante después de la hidrólisis enzimática. Para ello, se siguió el método de *Folin-Ciocalteu* (Singleton y Rossi, 1965). La muestra (200  $\mu$ L) se diluyó en agua destilada (800  $\mu$ L), añadiendo a continuación el reactivo de *Folin-Ciocalteu* (500  $\mu$ L). Pasados 3 min se adicionó carbonato sódico (2,5 mL, 20% p/v). Las muestras se taparon para evitar la luz y se incubaron durante 30 min, antes de medir la absorbancia a 725 nm. Los resultados se expresaron en g/L de equivalentes de catecol (EC), como modelo de fenoles libres presentes en fase líquida.

### 2.7.4 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Para estudiar el efecto de la lacasa en los prehidrolizados, se estudió la distribución de masas moleculares del prehidrolizado obtenido mediante *steam explosion* con vapor de agua. Las muestras se analizaron en columnas de exclusión molecular utilizando azul dextrano y ácido siríngico como patrones de alta y baja masa molecular, respectivamente (2004).

Muestras (2 mL) tratadas con lacasa de *C. rigida* se inyectaron en columnas de vidrio (3 x 50 cm, Pharmacia) empaquetadas con Sephadex G-100. Como fase móvil se utilizó NaOH 0,05 M, LiCl 0,025 M, a un flujo de 0,33 mL/min. La absorbancia de los compuestos separados por cromatografía se midió a 280 nm en un HPLC AKTA (Amersham Pharmacia Biotech) provisto de un inyector (INV-907) y una bomba

peristáltica (modelo P-920). Como paquete informático se empleó el programa UNICORN 3.0 (Amersham Pharmacia). Como control se analizó del mismo modo la muestra sin tratar con lacasa.

### 2.7.5 CROMATOGRAFÍA GASES

El contenido de azúcares de los *slurries*, antes y después de la hidrólisis enzimática, se determinó mediante GC. Para ello, se obtuvieron los acetatos de alditol de los monosacáridos presentes en las muestras (apartado 2.5.6).

También se valoró mediante GC la producción de etanol después de la fermentación con *S. cerevisiae* (apartado 2.7.2.2) de muestras tratadas y sin tratar con lacasa. Tras la fermentación se añadió directamente a los viales un patrón interno (0,5% metanol) y a continuación se extrajo el etanol con cloroformo (0,5 mL), cuantificándolo por GC. El análisis se realizó isotérmicamente a 30 °C en el mismo instrumento y con la misma columna descritos en el apartado 2.5.6, usando en esta ocasión temperaturas de 200 °C en inyector y detector y una presión del gas portador (helio) de 25 psi.

### 2.7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron los datos de “contenido fenólico”, aplicando un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significación del 95%, utilizando el programa Statgraphics plus versión 5.0. La comparación de los datos: “contenido de azúcares”, “etanol” y “concentración de levaduras”, se hizo mediante la prueba de *t*, con un nivel de significación del 95%, utilizando el mismo paquete informático.



### **3. RESULTADOS**



### **3.1 ESTUDIO DE COMPLEJOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES**



### 3.1.1 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ENCONTRADAS EN LOS COMPLEJOS COMERCIALES ESTUDIADOS

Los cócteles comerciales descritos en el apartado 2.3 (**Tabla 2.3**), se valoraron con la finalidad de conocer las actividades enzimáticas que presentaban cada uno de ellos. Estos complejos enzimáticos se conocen por la actividad mayoritaria que presentan. Sin embargo, normalmente presentan mezclas de actividades (algunas de ellas también en cantidades importantes) y su estudio tiene especial interés a nivel industrial. Un mayor conocimiento de las mismas facilitará adecuar su uso y dosificaciones en distintas aplicaciones. En este apartado se han valorado diferentes cócteles comerciales, todos proporcionados por Novozymes<sup>®</sup>, excepto el complejo Accellerase suministrado por Genencor<sup>®</sup>, que pueden presentar interés para la producción de bioalcohol a partir de grano de cereales o a partir de biomasa lignocelulósica.

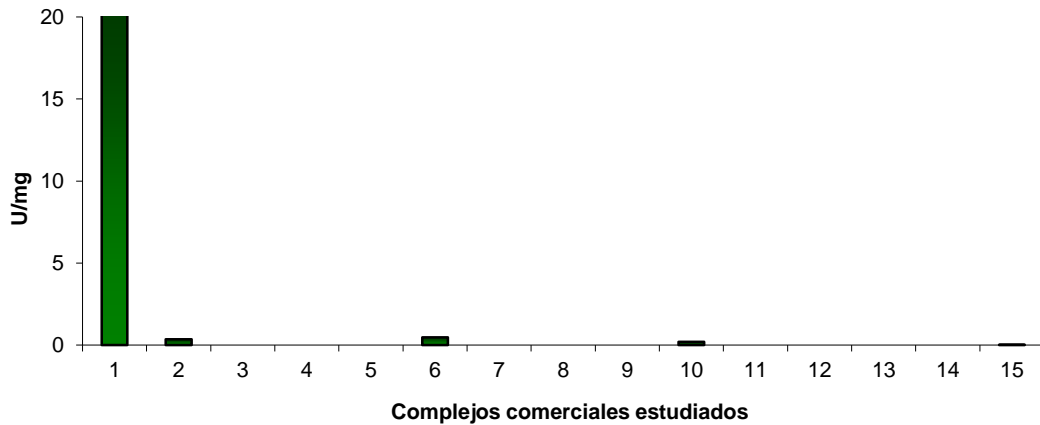
Las actividades valoradas en los distintos cócteles enzimáticos fueron: proteasa, amilasa, xilanasa, celulasa y  $\beta$ -(1,3)-glucanasa (apartado 2.4.3).

Los datos en las figuras corresponden a la actividad específica (U/mg o mU/mg de proteína) de los diferentes cócteles frente a los diferentes sustratos utilizados sobre los que estos tenían actividad. Los comentarios en el texto se expresan en porcentajes respecto al cóctel con mayor actividad (100%). A continuación se detallan los resultados encontrados.

#### 3.1.1.1 Actividad proteasa

En la **Figura 3.1** se puede ver los cócteles estudiados que presentaron esta actividad. El cóctel 1, Alcalase, presentó la máxima actividad proteasa, actividad mayoritaria descrita para este complejo. Se detectaron niveles muy bajos de esta actividad (< 2% respecto a este cóctel), en los complejos 2, Liquozyme, 6, Ultraflo, y 10, Novozym 50012, que es uno de los complejos que se encuentran en el kit de biomasa lignocelulósica, comercializado recientemente.



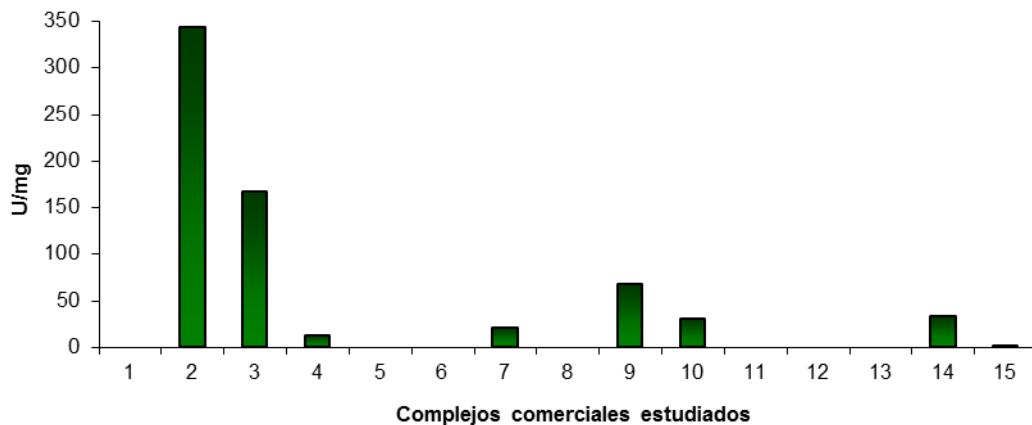


**Fig. 3.1.** Actividad proteasa en los distintos cócteles estudiados.

### 3.1.1.2. Actividades amiláceas

#### Actividad $\alpha$ -amilasa

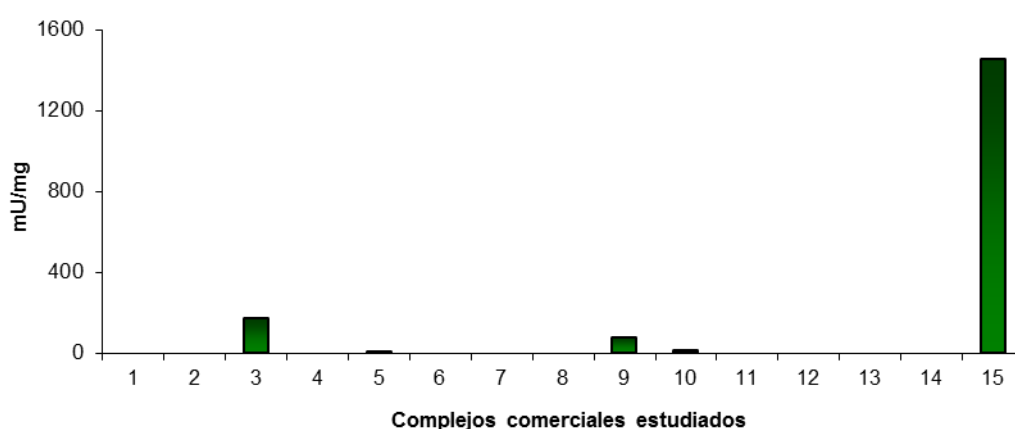
La **Figura 3.2** muestra la actividad  $\alpha$ -amilasa encontrada en los complejos comercializados estudiados. La máxima actividad se detectó en el cóctel 2, Liquozyme, coincidiendo con la actividad principal descrita en este complejo enzimático. Destacar que otros cócteles como el 3, Spirizyme Fuel, descrito como un complejo con actividad glucoamilasa, y el cóctel 9, Novozym 50010, descrito como un complejo con actividad  $\beta$ -glucosidasa, presentaron aproximadamente un 50% y 20%, respectivamente, de la actividad encontrada en el cóctel 2, Liquozyme.



**Fig. 3.2.** Actividad  $\alpha$ -amilasa en los distintos complejos estudiados.

### **Actividad glucoamilasa**

La **Figura 3.3** muestra la actividad glucoamilasa detectada en los complejos estudiados. La mayor actividad glucoamilasa se encontró en el cóctel 15, Accellerase, conocido por sus actividades  $\beta$ -glucosidasa y endoglucanasa. Cabe destacar que la actividad por la que se conoce el cóctel 3, Spirizyme Fuel, es precisamente la actividad glucoamilasa y solo presentó un 12% de la actividad encontrada respecto al cóctel 15. También se encontró aproximadamente un 5% de esta actividad en el complejo 9, Novozym 50010, que se comercializa como  $\beta$ -glucosidasa.



**Fig. 3.3.** Actividad glucoamilasa en los distintos complejos estudiados.

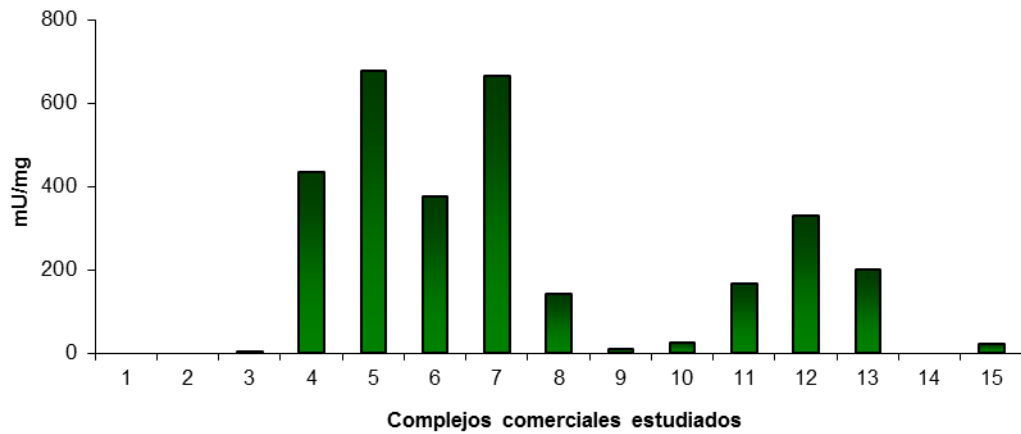
### **3.1.1.3. Actividades xilanolíticas**

#### **Actividad $\beta$ -xilosidasa**

La **Figura 3.4** muestra la actividad  $\beta$ -xilosidasa encontrada en los complejos estudiados. Se detectó la mayor actividad en los cócteles 5, Viscozyme Wheat, y 7, Viscozyme Rye, los dos comercializados como complejos con actividades xilanasa y endoglucanasa. El cóctel 4, Viscozyme Barley, conocido por sus actividades amilasa y celulasa, presentó un 64% de la actividad detectada en los cócteles 5 y 7.

También se detectó un 55% de esta actividad, respecto al cóctel 5 y 7, en el cóctel 6, Ultraflo, comercializado como complejo con actividad endoglucanasa. La actividad  $\beta$ -xilosidasa se encontró en la mayoría de los cócteles estudiados aunque en menores niveles.

## Resultados

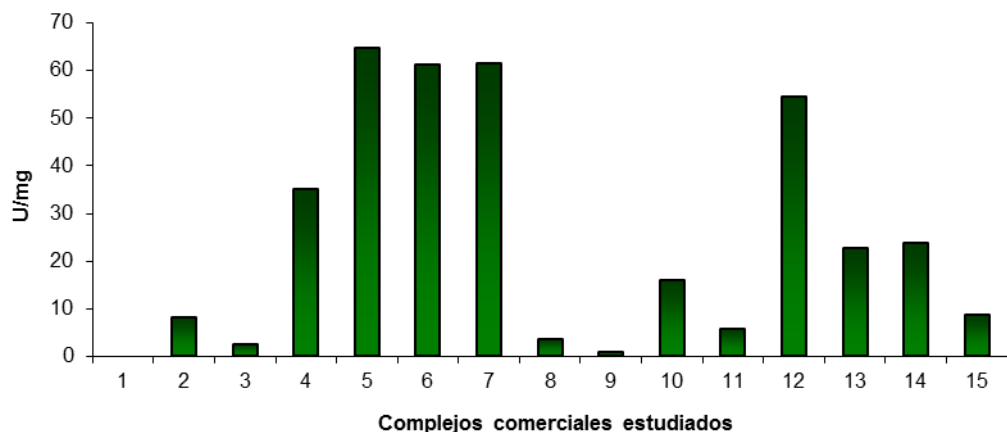


**Fig. 3.4.** Actividad  $\beta$ -xilosidasa en los distintos complejos estudiados.

### Actividad xilanasa

La **Figura 3.5** muestra como la mayoría de los complejos valorados contienen también actividad xilanasa. La mayor actividad se encontró en los cócteles 5, Viscozyme Wheat, y 7, Viscozyme Rye, coincidiendo en este caso con una de las actividades descritas en estos complejos (xilanasa y endoglucanasa).

Niveles similares de actividad (95% respecto a los cócteles 5 o 7) se encontraron en el cóctel 6, Ultraflo, conocido por su actividad endoglucanasa. También se detectaron niveles muy altos de xilanasa (84%) en el complejo 12, Novozym 50030, que forma parte del kit comercializado por Novozymes® para biomasa lignocelulósica.



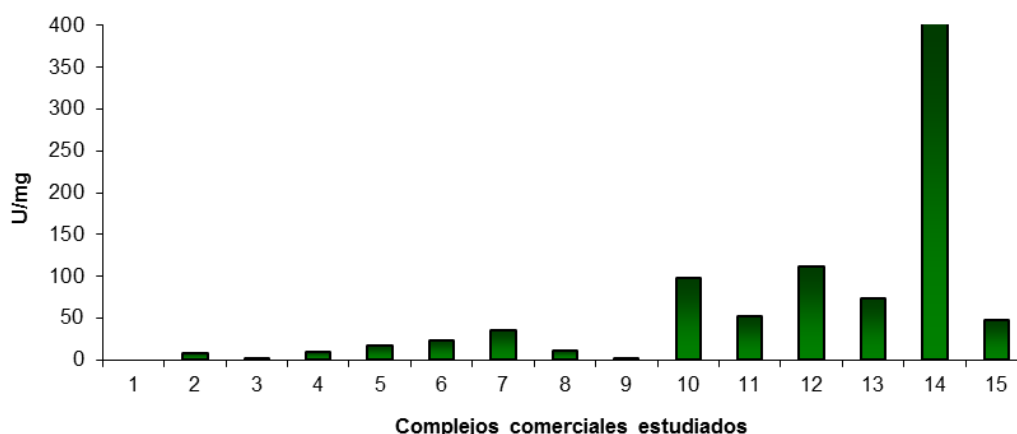
**Fig. 3.5.** Actividad xilanasa en los distintos complejos estudiados.

### 3.1.1.4. Actividades celulolíticas

#### Actividad endoglucanasa

En la **Figura 3.6** se muestra la actividad endoglucanasa detectada en los complejos estudiados. Los mayores niveles de actividad endoglucanasa se encontraron en el cóctel 14, Novozym 50070, descrito como un cóctel con actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa. Esta actividad se encuentra también en la mayoría de los cócteles estudiados aunque es mayor en los complejos 10, Novozym 50012, y 12, Novozym 50030, ambos presentes en el kit comercializado para biomasa lignocelulósica, con aproximadamente un 30% de esta actividad respecto al máximo encontrado.

Destacar en este caso que ninguno de los complejos conocidos por su actividad endoglucanasa, cócteles 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye y 15, Accellerase, superaron los niveles detectados en el complejo 14, Novozym 50070.



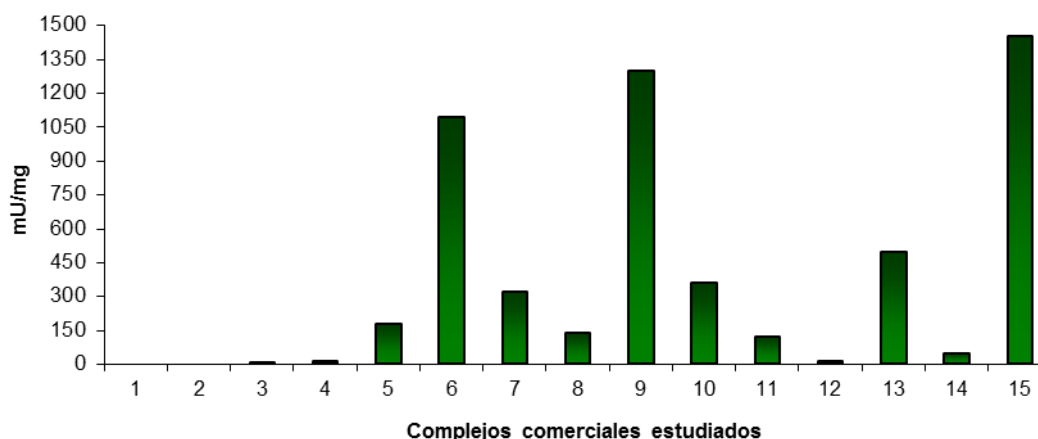
**Fig. 3.6.** Actividad endoglucanasa en los distintos complejos estudiados.

#### Actividad $\beta$ -glucosidasa

La **Figura 3.7** muestra la actividad  $\beta$ -glucosidasa encontrada en los complejos enzimáticos estudiados. Los complejos 9, Novozym 50010, y 15, Accellerase, presentaron la máxima actividad, coincidiendo con la actividad descrita en estos complejos.

Destacar que tanto en el cóctel 6, Ultraflo, en el que la endoglucanasa es la actividad conocida, como en el 13, Novozym 22002,

perteneciente al kit de biomasa, se encontró un 75% y 35% de actividad  $\beta$ -glucosidasa máxima, respectivamente.

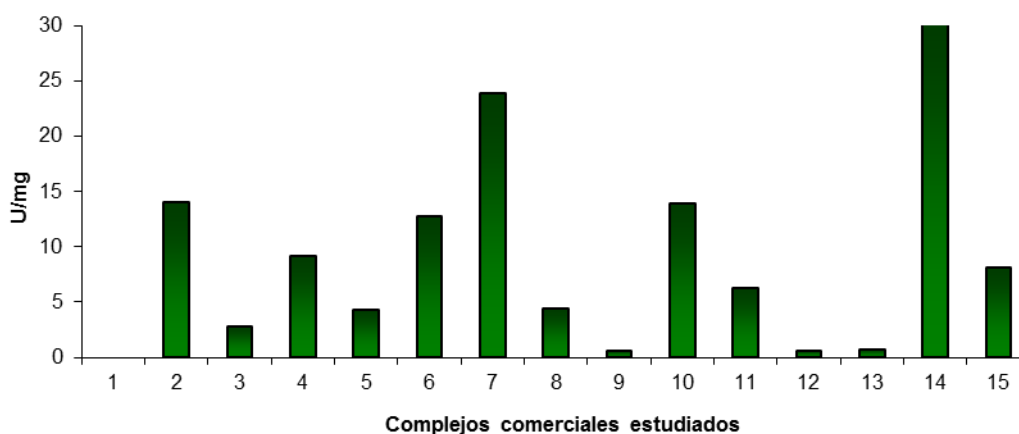


**Fig. 3.7.** Actividad  $\beta$ -glucosidasa en los distintos complejos estudiados.

### **Actividad avicelasa o celulasa total**

Como se observa en la **Figura 3.8**, el cóctel 14, Novozym 50070, comercializado como  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, presentó la mayor actividad avicelasa. Destacar que en el cóctel 7, Viscozyme Rye, comercializado como xilanasa y endoglucanasa, se encontró el 78% de la actividad máxima y en los cócteles 2, Liquozyme, conocido por su actividad  $\alpha$ -amilasa, y 10, Novozym 50012, del kit de biomasa, se detectó un 45%, respecto al cóctel que presentó mayor actividad.

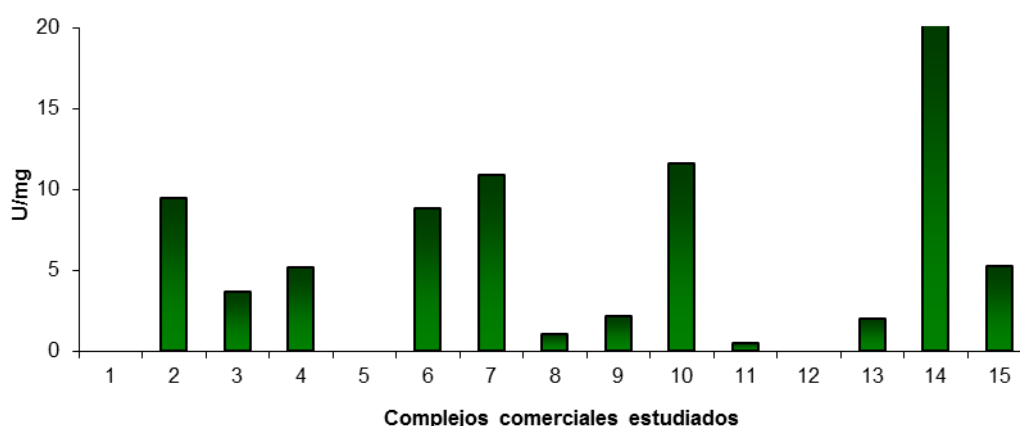
Estos valores de actividad son mayores que los que presentan los complejos 4, Viscozyme Barley, y 8, Celluclast, comercializados como celulasas (30% y 15%, respectivamente).



**Fig. 3.8.** Actividad avicelasa en los distintos complejos estudiados.

### 3.1.1.5. Actividad $\beta$ -(1,3)-glucanasa

Los niveles mayores de actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa se encontraron en el complejo 14, Novozym 50070, coincidiendo este resultado con la actividad descrita. En la **Figura 3.9** se observa cómo distintos cócteles comercializados con otras actividades, como el complejo 2, Liquozyme ( $\alpha$ -amilasa), el 6, Ultraflo (endoglucanasa), 7, Viscozyme Rye (xilanasa y endoglucanasa) y 10, Novozym 50012 (del kit biomasa), presentaron una actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa alrededor del 50% de la descrita en el complejo 14.



**Fig. 3.9.** Actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa en los distintos complejos estudiados.

### 3.1.1.6 Resumen de actividades

La **Tabla 3.1** muestra un resumen de las actividades estudiadas y encontradas en los distintos complejos comerciales utilizados en este trabajo.

## Resultados

**Tabla 3.1.** Actividades enzimáticas presentes en los cócteles comerciales estudiados.

COMPLEJOS COMERCIALES			ACTIVIDADES DETECTADAS							
Nombre comercial	Actividad descrita	Proteínas (mg/mL)	$\alpha$ -Amilasa		Glucoamilasa		Proteasa		$\beta$ -(1,3)-Glucanasa	
			U/mL	U/mg	mU/mL	mU/mg	U	U/mg	U/mL	U/mg
1	Alcalase 2,5 L	42	-	-	-	-	882,4	21,0	-	-
2	Liquozyme SC DS	23	7905,4	343,7	-	-	8,1	0,4	217,8	9,5
3	Spirizyme Fuel	130	21687,8	166,8	21907,9	168,5	-	-	480,4	3,7
4	Viscozyme Barley	35	415,3	11,9	-	-	-	-	180,4	5,2
5	Viscozyme Wheat	31	-	-	26,3	0,8	-	-	-	-
6	Ultraflo L	7	-	-	-	-	3,3	0,5	61,7	8,8
7	Viscozyme Rye	19	394,2	20,7	-	-	-	-	206,0	10,8
8	Celluclast 1,5 L FG	81	-	-	-	-	-	-	82,6	1,0
9	Novozym 50010	68	4608,2	67,8	5223,7	76,8	-	-	148,9	2,2
10	NS-50012	36	1055,8	29,3	492,1	13,7	6,8	0,2	416,8	11,6
11	NS-50013	81	-	-	-	-	-	-	37,5	0,5
12	NS-50030	17	-	-	-	-	-	-	-	-
13	NS-22002	20	-	-	-	-	-	-	39,9	2,0
14	Novozym 50070	35	1147,1	32,8	-	-	-	-	715,2	20,4
15	Accellerase 1000	43	63,7	1,5	62368,4	1450,4	1,1	-	225,0	5,2

Nombre comercial	Actividad descrita	Proteínas (mg/mL)	$\beta$ -Xilosidasa		Xilanasa		$\beta$ -Glucosidasa		Endoglucanasa		Avicelasa	
			mU/mL	mU/mg	U/mL	U/mg	mU/mL	mU/mg	U/mL	U/mg	U/mL	U/mg
1	Alcalase 2,5 L	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Liquozyme SC DS	23	-	-	188,4	8,2	-	-	191,8	8,3	321,4	14,0
3	Spirizyme Fuel	130	157,9	1,2	300,5	2,3	100,0	0,8	157,2	1,2	362,9	2,8
4	Viscozyme Barley	35	15263,2	436,1	1228,5	35,1	473,7	13,5	317,4	9,1	321,4	9,2
5	Viscozyme Wheat	31	21052,6	679,1	2006,0	64,7	5473,7	176,6	517,8	16,7	133,1	4,3
6	Ultraflo L	7	2631,6	375,9	428,3	61,2	7631,6	1090,2	157,9	22,6	89,4	12,8
7	Viscozyme Rye	19	12631,6	664,8	1168,2	61,5	6065,8	319,3	655,8	34,5	453,3	23,9
8	Celluclast 1,5 L FG	81	11578,9	142,9	285,6	3,5	10894,7	134,5	915,0	11,3	357,6	4,4
9	Novozym 50010	68	775,0	11,4	56,5	0,8	88026,3	1294,5	134,6	2,0	40,9	0,6
10	NS-50012	36	868,4	24,1	568,4	15,8	12894,7	358,2	3505,1	97,4	500,8	13,9
11	NS-50013	81	13473,7	166,3	459,0	5,7	9473,7	117,0	4239,0	52,3	503,8	6,2
12	NS-50030	17	5631,6	331,3	924,1	54,4	171,1	10,1	1888,2	111,1	8,8	0,5
13	NS-22002	20	4000,0	200,0	450,0	22,5	9868,4	493,4	1466,2	73,3	13,0	0,7
14	Novozym 50070	35	-	-	827,6	23,6	1552,6	44,4	14062,7	401,8	1074,4	30,7
15	Accellerase 1000	43	986,8	22,9	370,5	8,6	62368,4	1450,4	2038,9	47,4	348,6	8,1

### 3.1.2 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS

Esta caracterización se planteó con la intención de conocer el rango de estabilidad de las actividades encontradas en los distintos complejos estudiados. El estudio se realizó con los nueve primeros cócteles comerciales ensayados (**Tabla 2.4**) y en ellos se caracterizaron las actividades enzimáticas más representativas.

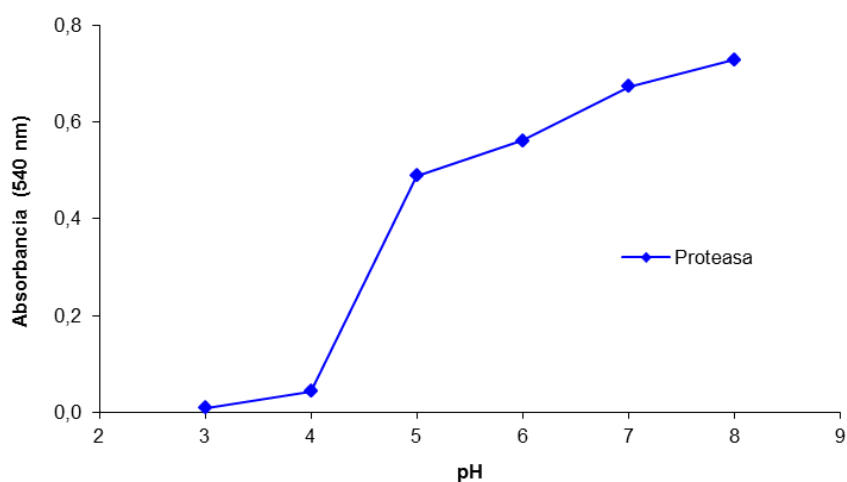
#### 3.1.2.1 pH óptimo de los complejos enzimáticos

El pH óptimo de las actividades en los complejos enzimáticos valorados se determinó en tampón CFB 100 mM, en un rango de pH de 3 a 8, a temperatura ambiente (apartado 2.4.4). Las distintas actividades enzimáticas se valoraron siguiendo las indicaciones descritas a lo largo del apartado 2.4.3.

Los resultados de la estimación del pH óptimo en los distintos complejos comerciales estudiados se expresaron en unidades de absorbancia.

#### Cóctel 1, Alcalase

Este complejo comercial solo tiene actividad proteasa por lo que se valoró exclusivamente su pH óptimo sobre azocaseína. La **Figura 3.10** muestra que este cóctel presenta una mayor capacidad de hidrólisis de la azocaseína a pH 7 y 8.

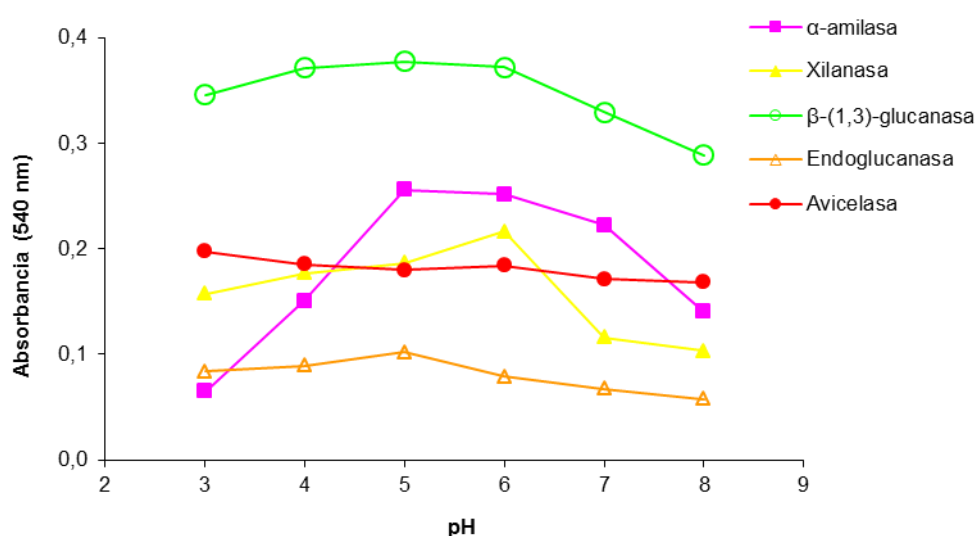


**Fig. 3.10.** pH óptimo del cóctel 1, Alcalase.



### Cóctel 2, Liquozyme

Se determinó el pH óptimo de este cóctel, conocido por su actividad  $\alpha$ -amilasa, sobre almidón soluble, xilano, laminarina, carboximetilcelulosa y avicel, ya que se había comprobado (apartado anterior) que mostraba actividad sobre todos estos sustratos. La **Figura 3.11** muestra la curva de pH óptimo en función de los sustratos utilizados que corresponden con las actividades  $\alpha$ -amilasa, xilanasa,  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, endo- $\beta$ -(1,4)-glucanasa y avicelasa, respectivamente. En esta figura se observa que la mayoría de las actividades fueron más altas entre pH 5 y 6, resaltando que la avicelasa presentó niveles muy altos de actividad en todo el rango de pH estudiado.



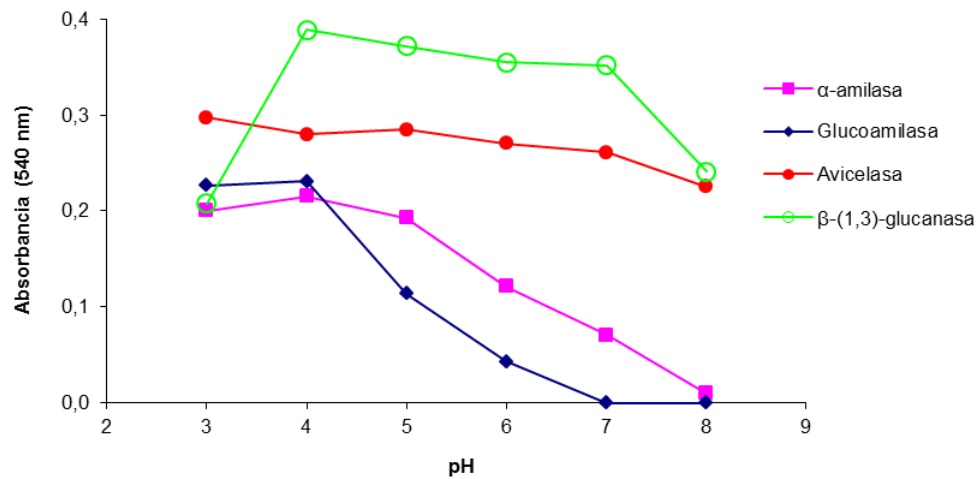
**Fig. 3.11.** pH óptimo de las actividades enzimáticas del cóctel 2, Liquozyme.

### Cóctel 3, Spirizyme Fuel

La determinación del pH óptimo de este cóctel, conocido por su actividad glucoamilasa, se valoró sobre almidón soluble, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, avicel y laminarina, sustratos de las actividades  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa, avicelasa y  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, respectivamente.

En la **Figura 3.12** se observa que el complejo es más activo a pH 4 y 5, excepto la glucoamilasa que fue mayor a pH 3 y 4. Cabe resaltar que la avicelasa y la  $\beta$ -(1,3)-glucanasa mostraron similar actividad entre pH 4 y 7.

## Resultados

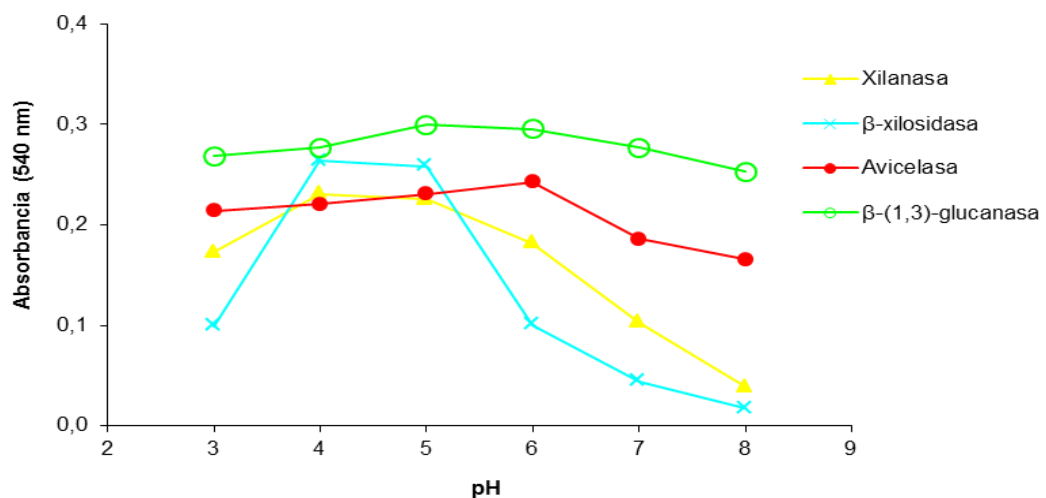


**Fig. 3.12.** pH óptimo de las actividades enzimáticas del cóctel 3, Spirizyme Fuel.

### Cóctel 4, Viscozyme Barley

La determinación del pH óptimo del cóctel comercial 4, Viscozyme Barley, se valoró sobre, xilano, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido, avicel y laminarina, sustratos de las actividades mayoritarias encontradas en este cóctel: xilanasa,  $\beta$ -xilosidasa, avicelasa y  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, respectivamente.

La **Figura 3.13** muestra como la mayoría de las actividades encontradas en este complejo fueron mayores entre pH 4 y 5. La  $\beta$ -(1,3)-glucanasa y la avicelasa fueron también muy altas entre pH 5 y 6.

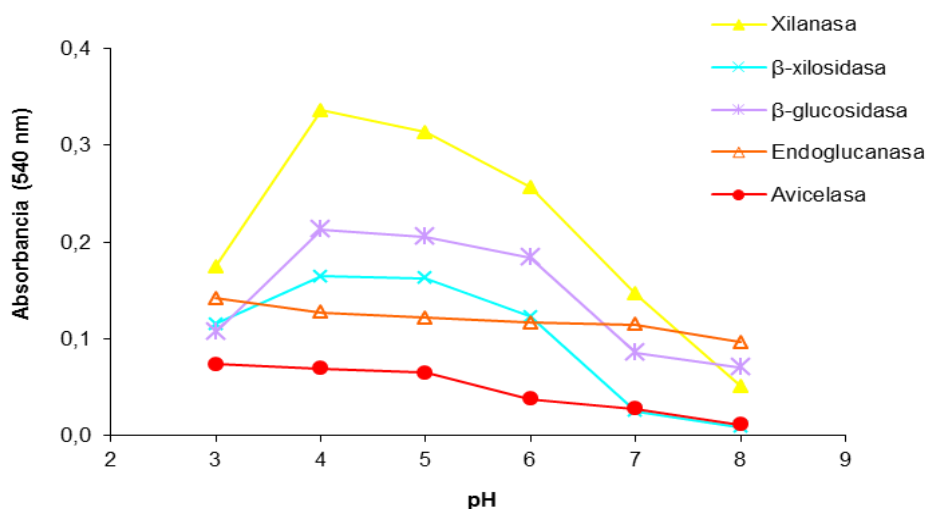


**Fig. 3.13.** pH óptimo de las actividades enzimáticas del cóctel 4, Viscozyme Barley.

### Cóctel 5, Viscozyme Wheat

El pH óptimo del cóctel 5, Viscozyme Wheat, se valoró sobre, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido, xilano, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, avicel y carboximetilcelulosa, sustratos de las actividades mayoritarias encontradas en este cóctel:  $\beta$ -xilosidasa, xilanasa,  $\beta$ -glucosidasa, avicelasa y endoglucanasa.

Generalmente todas las actividades presentes en este complejo (**Fig. 3.14**), fueron mayores a pH ácidos, entre 4 y 5, destacando que la endoglucanasa mostró similar actividad entre pH 4 y 7.



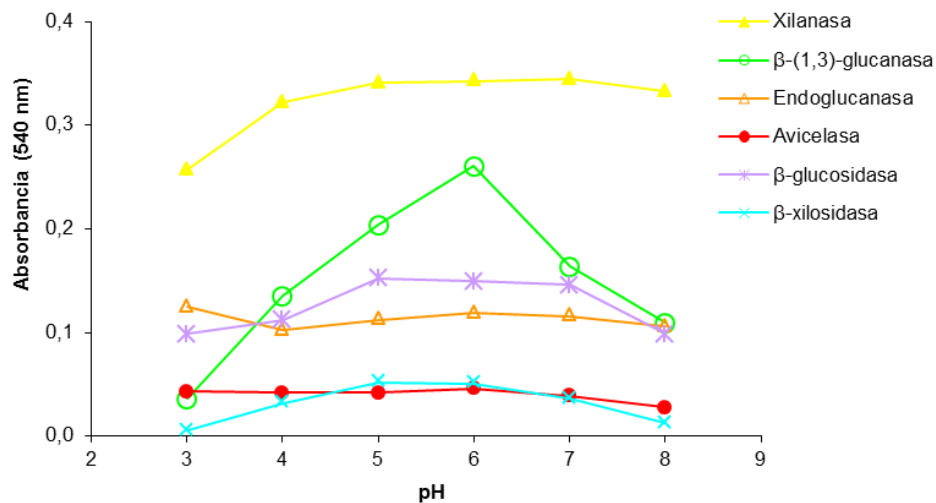
**Fig.3.14.** pH óptimo de las actividades enzimáticas del cóctel 5, Viscozyme Wheat.

### Cóctel 6, Ultraflo

En el cóctel 6, Ultraflo, los sustratos usados para la determinación del pH óptimo fueron: *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido, xilano, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, carboximetilcelulosa, avicel y laminarina, que corresponden a las actividades mayoritarias encontradas en este cóctel:  $\beta$ -xilosidasa, xilanasa,  $\beta$ -glucosidasa, endoglucanasa, avicelasa y  $\beta$ -(1,3)-glucanasa.

En la **Figura 3.15** se observa que todas las actividades fueron mayores entre pH 5 y 7, excepto la actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa que fue mucho mayor a pH 6.

## Resultados

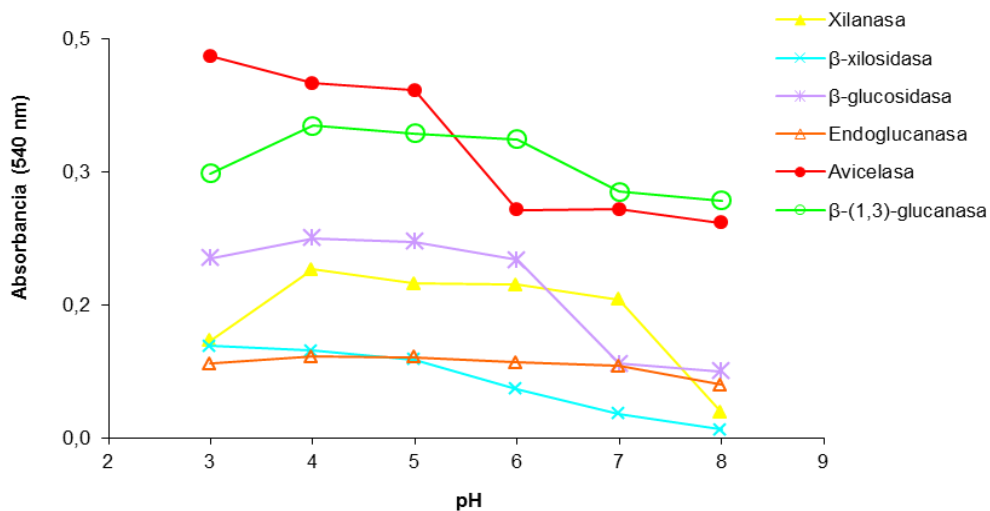


**Fig. 3.15.** pH óptimo de las actividades enzimáticas del cóctel 6, Ultraflo.

### Cóctel 7, Viscozyme Rye

La determinación del pH óptimo del cóctel 7 se valoró sobre carboximetilcelulosa, *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosido, xilano, *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosido, avicel y laminarina. Estos sustratos corresponden a las actividades mayoritarias encontradas en este cóctel: endoglucanasa, β-xilosidasa, xilanasa, β-glucosidasa, avicelasa y β-(1,3)-glucanasa.

En la **Figura 3.16** se observa que todas las actividades fueron mayores a pH ácidos (pH 4 y 5).

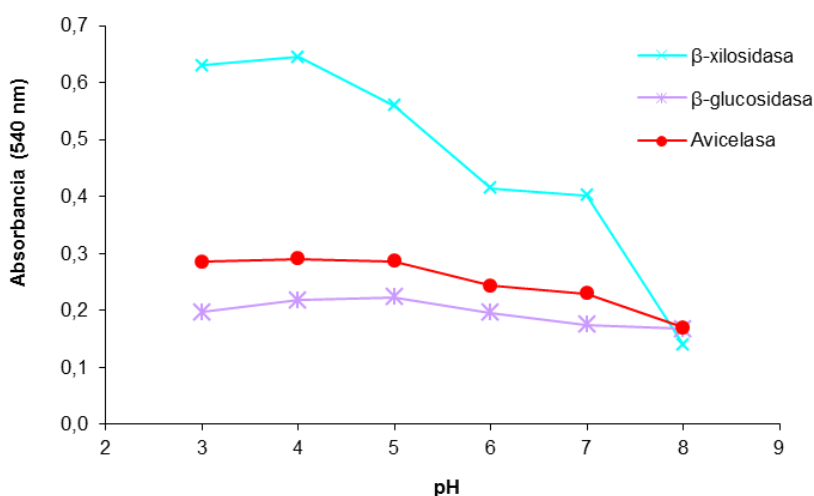


**Fig. 3.16.** pH óptimo de las actividades enzimáticas del cóctel 7, Viscozyme Rye.

### Cóctel 8, Celluclast

El pH óptimo del cóctel 8 se valoró sobre *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido, avicel y *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido. Estos sustratos corresponden a las máximas actividades encontradas en este cóctel:  $\beta$ -xilosidasa, avicelasa y  $\beta$ -glucosidasa.

La **Figura 3.17** muestra que la actividad  $\beta$ -xilosidasa fue mayor a pH ácidos (pH 4 y 5) mientras la avicelasa y la  $\beta$ -glucosidasa mantuvieron su actividad en un rango amplio de pH (pH 3-7).

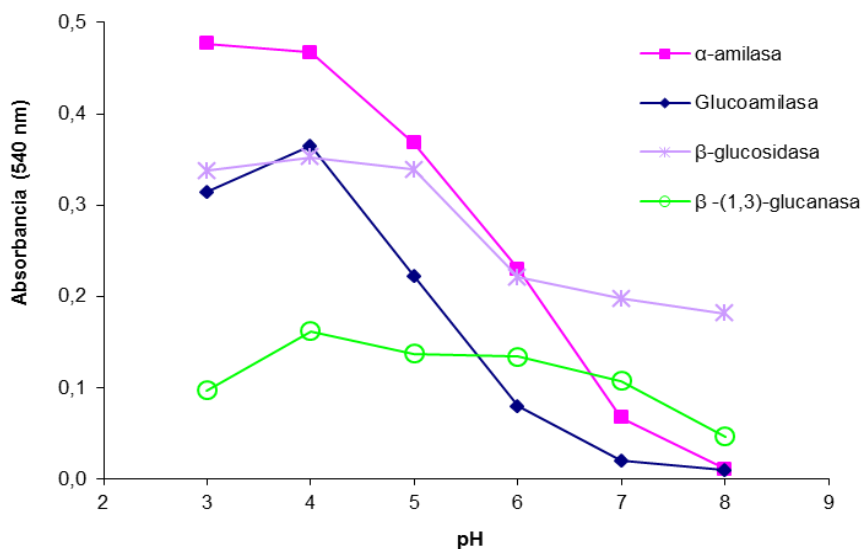


**Fig. 3.17.** pH óptimo de las actividades enzimáticas del cóctel 8, Celluclast.

### Cóctel 9, Novozym 50010

El pH óptimo del cóctel 9 se valoró sobre: almidón, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido y laminarina. Estos sustratos corresponden a las máximas actividades encontradas en este cóctel:  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -(1,3)-glucanasa.

En general, se observaron mayores actividades a pH ácidos (pH 3-5) aunque la actividad  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa fueron mucho mayores entre pH 3 y 4 (**Fig. 3.18**). Cabe destacar que algunas de las actividades detectadas desaparecían prácticamente entre pH 6 y 8.



**Fig.3.18.** pH óptimo de las actividades enzimáticas del cóctel 9, Novozym 50010.

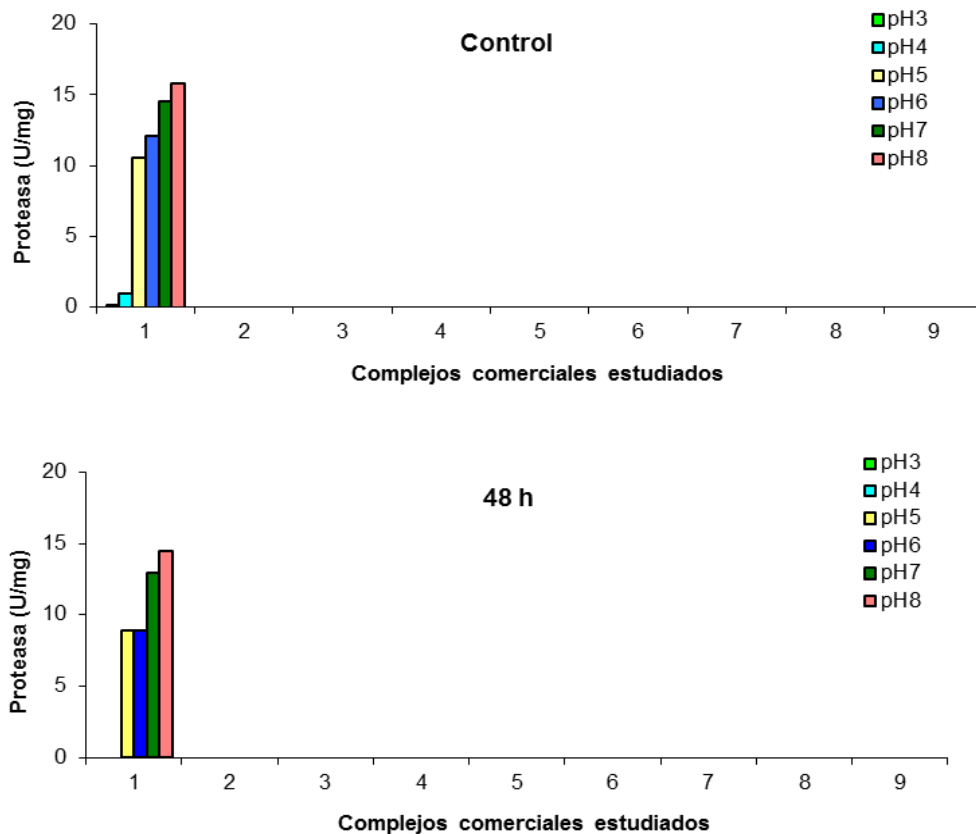
### 3.1.2.2 Estabilidad al pH de los complejos enzimáticos

Para la determinación de la estabilidad a pH en los distintos cócteles comerciales, estos se incubaron durante 4, 8, 24 y 48 h en tampón acetato 50 mM (apartado 2.4.4). Con el fin de facilitar la lectura, en cada gráfica se muestran todas las actividades encontradas en los diferentes complejos, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación, entre pH 3 y pH 8. Las actividades de cada complejo han sido descritas anteriormente en el apartado 3.1.1.

#### Actividad proteasa

La **Figura 3.19** muestra la estabilidad al pH del cóctel 1, Alcalase. Como puede observarse en esta figura, esta actividad proteasa desaparece a pH menor de 5 tras 48 h de incubación, presentando mayor estabilidad a pH 7 y 8.

## Resultados



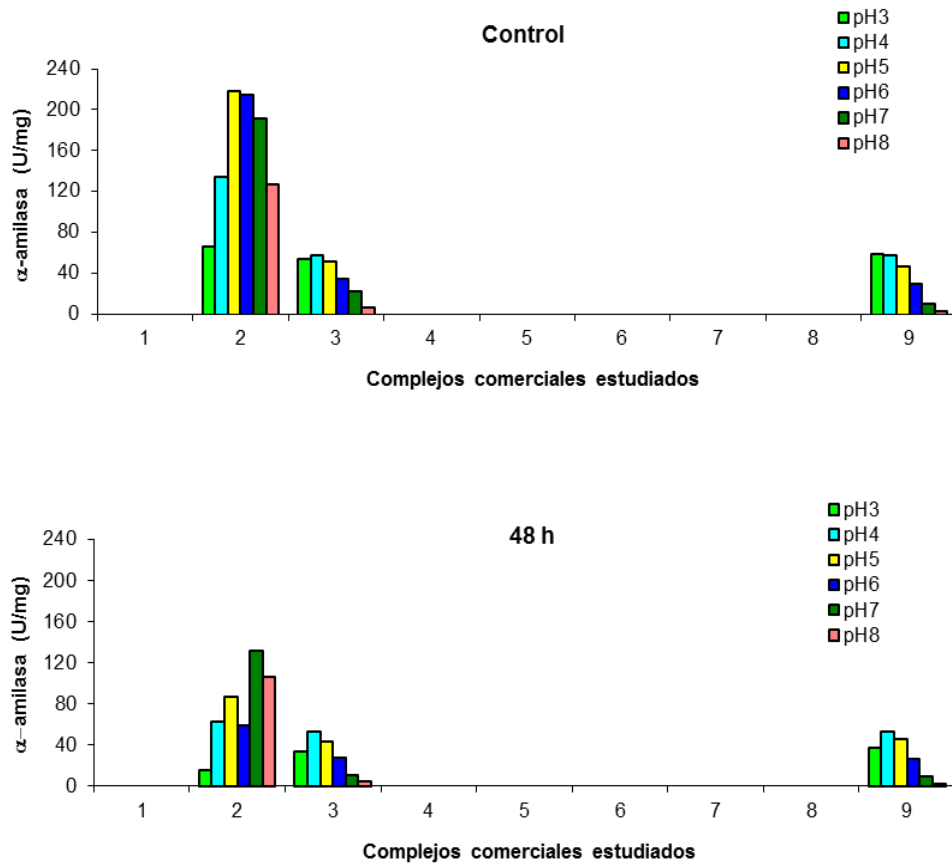
**Fig. 3.19.** Estabilidad a distintos pH de la actividad proteasa encontrada en el cóctel 1, Alcalase, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.

## Actividades amiláceas

### Actividad $\alpha$ -amilasa

La **Figura 3.20** muestra cómo el cóctel 2, Liquozyme, presentó mayor actividad  $\alpha$ -amilasa, siendo esta más estable a pH 7 y 8. A valores inferiores de pH, tras 48 h de incubación, la actividad disminuyó aproximadamente al menos un 40%. Los cócteles 3, Spirizyme Fuel, y 9, Novozym 50010, cuyas actividades descritas son glucoamilasa y  $\beta$ -glucosidasa, respectivamente, también mostraron actividad  $\alpha$ -amilasa, aunque en este caso la estabilidad fue mayor a pH 4 y pH 5.

## Resultados



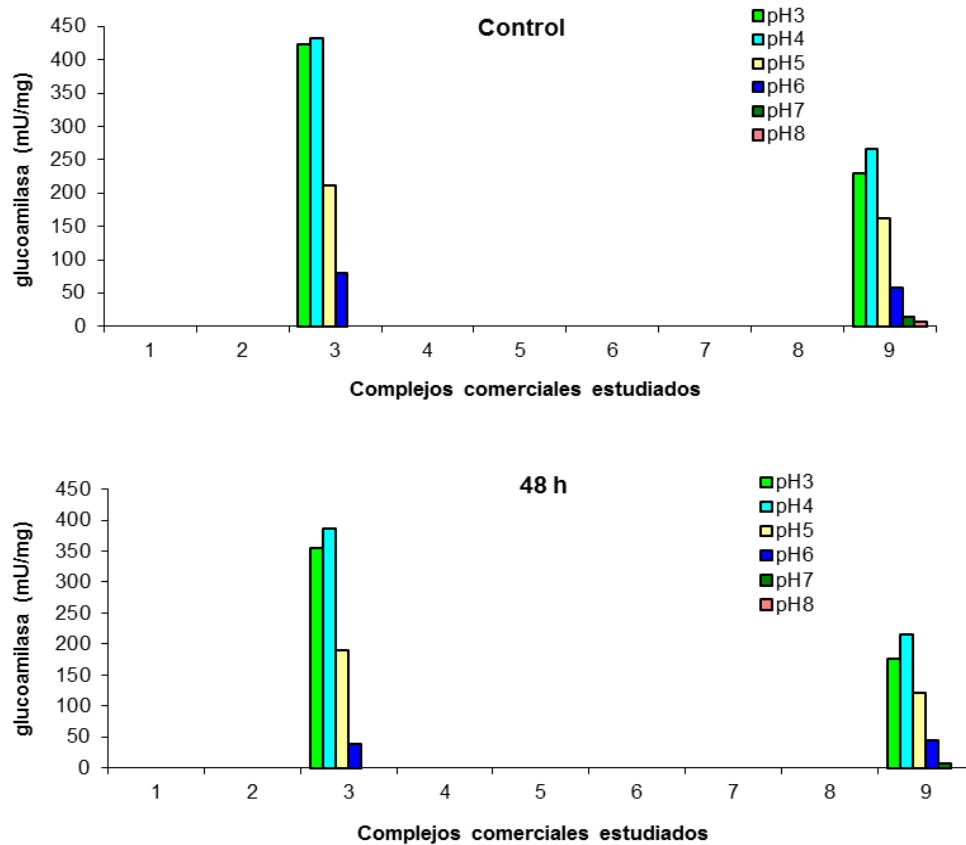
**Fig. 3.20.** Estabilidad a distintos pH de la actividad  $\alpha$ -amilasa en los cócteles 2, Liquozyme, 3, Spirizyme Fuel, y 9, Novozym 50010.

### Actividad glucoamilasa

Se determinó la estabilidad de los complejos enzimáticos para la actividad glucoamilasa tanto en el cóctel 3, Spirizyme Fuel, conocido por esta actividad, como en el cóctel 9, Novozym 50010, cuya actividad descrita es  $\beta$ -glucosidasa. Destacó la estabilidad de la actividad glucoamilasa en ambos cócteles a pH ácidos, manteniéndose esta actividad en torno al 80%, tras 48 h de incubación, a pH 3 y 4 (**Fig. 3.21**).



## Resultados



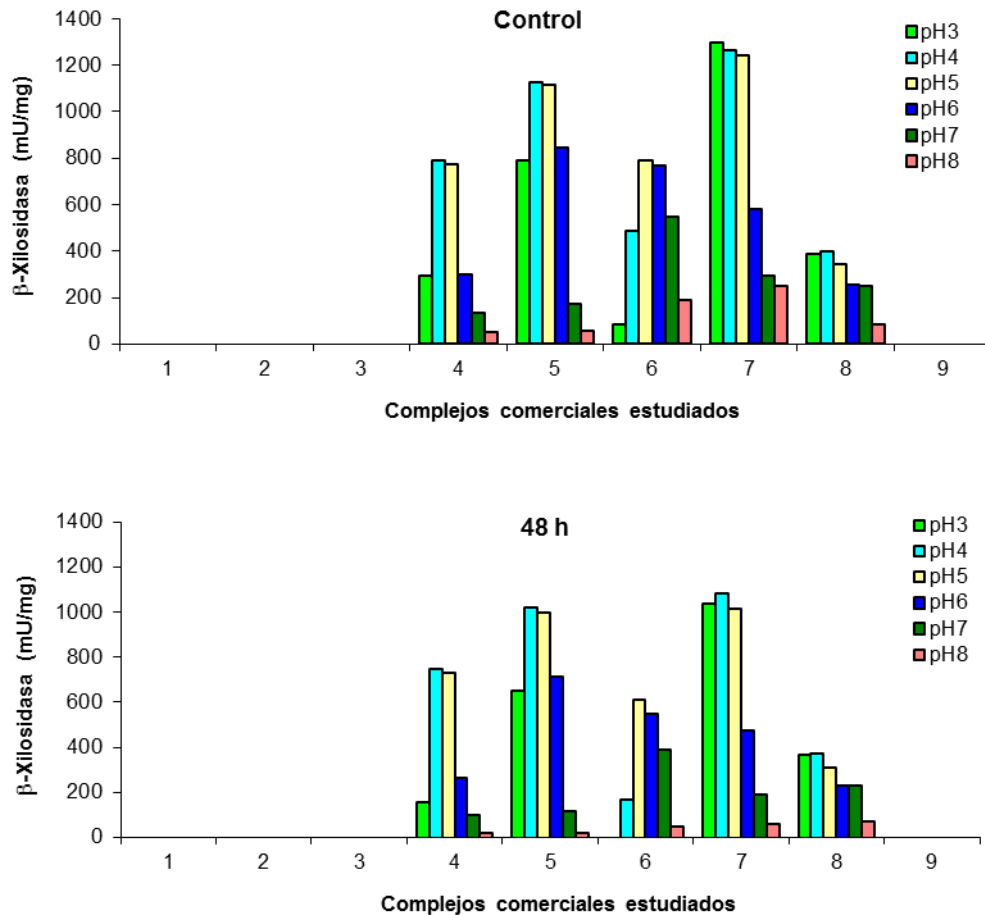
**Fig. 3.21.** Estabilidad a distintos pH de la actividad glucoamilasa en los cócteles 3, Spirizyme Fuel, y 9, Novozym 50010.

## Actividades xilanolíticas

### Actividad $\beta$ -xilosidasa

En general, los complejos valorados presentaron una alta estabilidad a lo largo del rango de pH estudiado. Destacar los cócteles 5, Viscozyme Wheat, y 7 Viscozyme Rye, que son los que mayor actividad presentan. En todos los casos la estabilidad fue muy alta, tras 48 h de incubación, aunque la actividad fue mayor entre pH 3 y 5 (**Fig. 3.22**). En el cóctel 4, Viscozyme Barley, conocido por su actividad amilasa y celulasa, la actividad  $\beta$ -xilosidasa fue muy estable entre pH 4 y 5 (95% tras 48 h de incubación). El cóctel 6, Ultraflo, descrito como endoglucanasa, mantuvo un 77% de esta actividad a pH 5 y 6, tras las 48h de incubación.

## Resultados

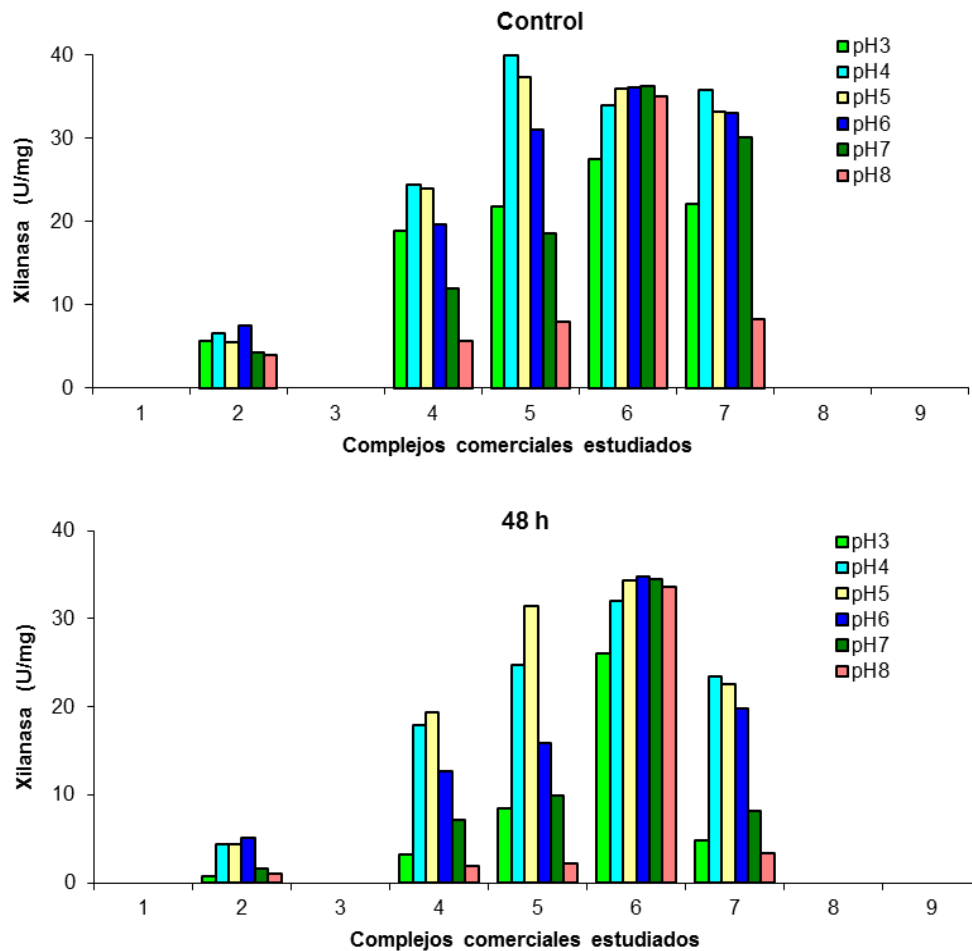


**Fig. 3.22.** Estabilidad frente a pH de la actividad  $\beta$ -xilosaasa en los cócteles 4, Viscozyme Barley, 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye y 8, Celluclast.

### Actividad xilanasa

La **Figura 3.23** muestra como el cóctel 5, Viscozyme Wheat, con actividad descrita xilanasa y endoglucanasa, presentó una alta estabilidad a pH 5 de la actividad xilanasa, manteniendo alrededor de un 85% de la misma tras 48 h de incubación. A pH 4 se conservó en torno al 65% de la actividad. Lo mismo ocurrió en el cóctel 7, Viscozyme Rye. Destacar que la estabilidad de la actividad xilanasa en el cóctel 6, Ultraflo, conocido por su actividad endoglucanasa, se mantuvo constante a lo largo de todo el rango de pH estudiado.

## Resultados



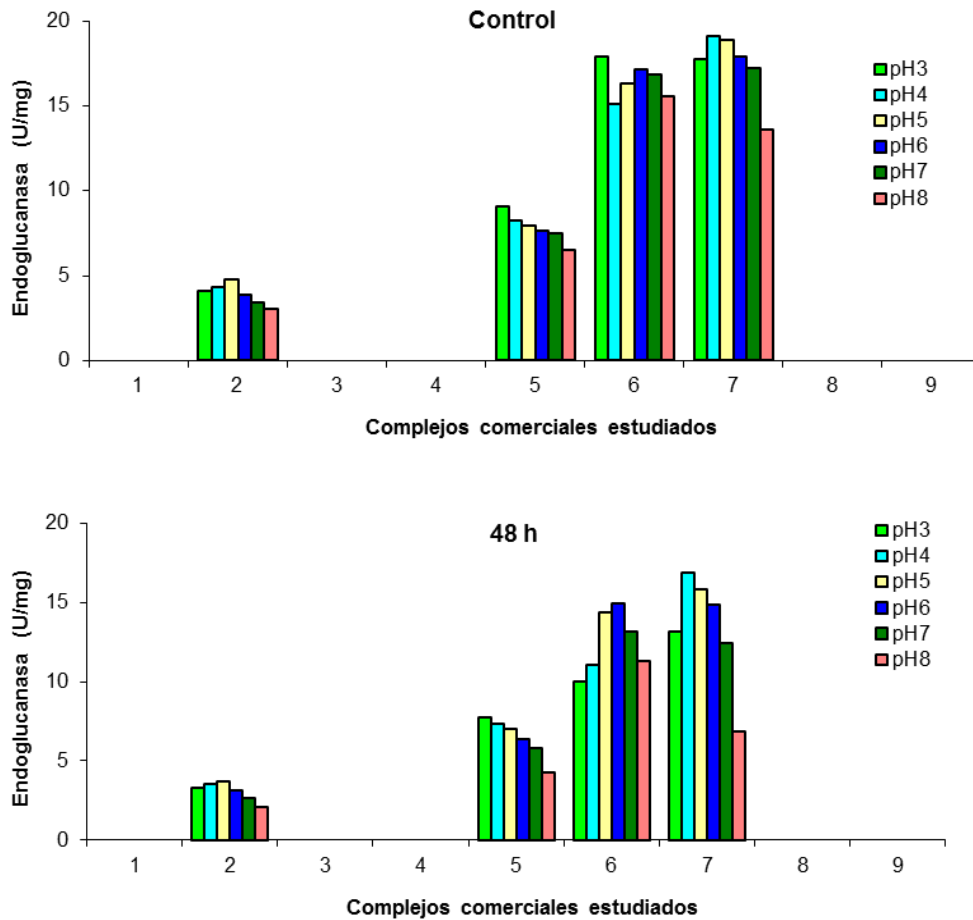
**Fig. 3.23.** Estabilidad a distintos pH de la actividad xilanasa en los cócteles 2, Liquozyme, 4, Viscozyme Barley, 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye.

## Actividades celulolíticas

### Actividad endoglucanasa

La **Figura 3.24** muestra la estabilidad de la actividad endoglucanasa en los complejos comerciales valorados. Destacaron los cócteles 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye, conocidos por sus actividades xilanasa y/o endoglucanasa, que mantuvieron una actividad endoglucanasa en torno al 80% tras 48 h de incubación, entre pH 3 y 6. El cóctel 2, Liquozyme, con actividad  $\alpha$ -amilasa, pese a tener menor actividad endoglucanasa, mantuvo similar nivel de actividad, tras 48 de incubación, a todos los pH estudiados.

## Resultados

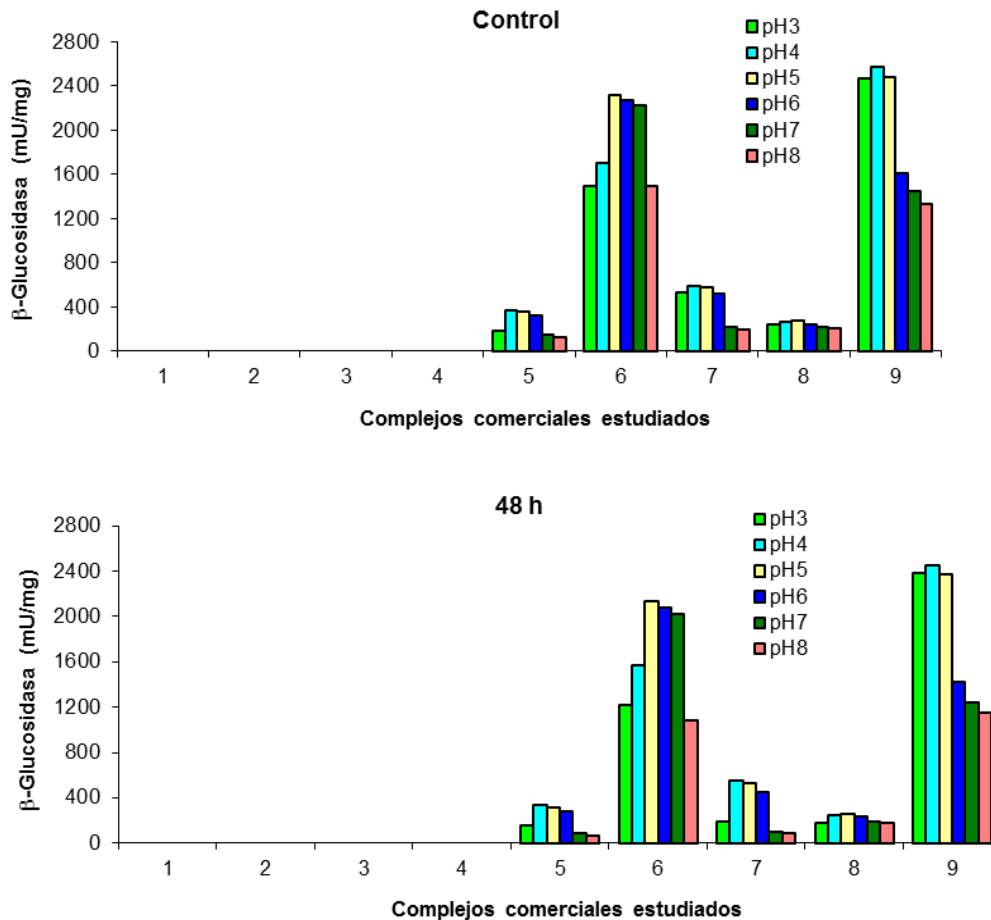


**Fig. 3.24.** Estabilidad a distintos pH de la actividad endoglucanasa en los cócteles 2, Ligozyme, 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye.

### Actividad $\beta$ -glucosidasa

Se valoró la estabilidad de esta actividad en distintos complejos enzimáticos. El cóctel 9, Novozym 50010, con actividad descrita  $\beta$ -glucosidasa mostró una alta estabilidad en todo el rango de pH estudiado. El resto de cócteles valorados fueron muy estables entre pH 5 y 8 (**Fig. 3.25**).

## Resultados

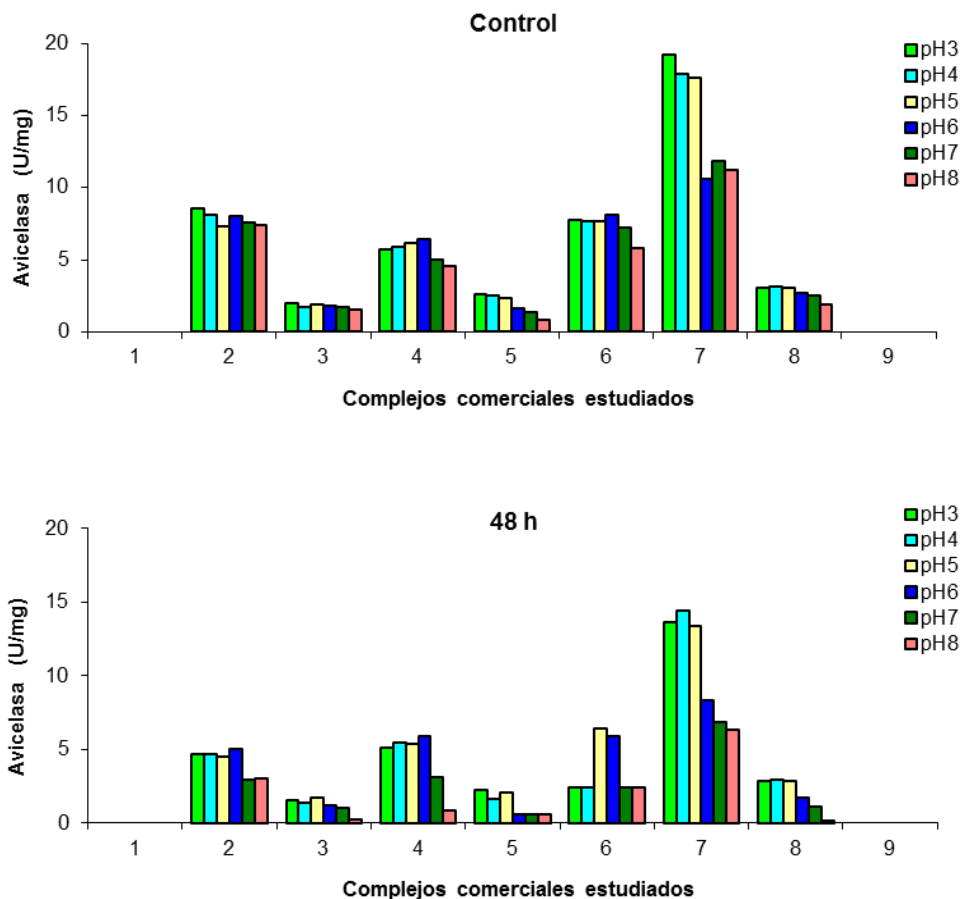


**Fig. 3.25.** Estabilidad a distintos pH de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en los cócteles 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye, 8, Celluclast, y 9 Novozym 50010.

### Actividad avicelasa o celulasa total

Los complejos estudiados fueron generalmente más estables a pH 5 y 6. En el caso del complejo 7, Viscozyme Rye, conocido por su actividad xilanasa y endoglucanasa, mantuvo una gran estabilidad entre pH 3 y 5 tras 48 h de incubación. Destacar que los complejos descritos con actividad celulasa como el cóctel 4, Viscozyme Barley, y el cóctel 8, Celluclast, presentaron una actividad en torno al 90% respecto a la inicial entre pH 3-6, y 3-5, respectivamente (**Fig. 3.26**).

## Resultados

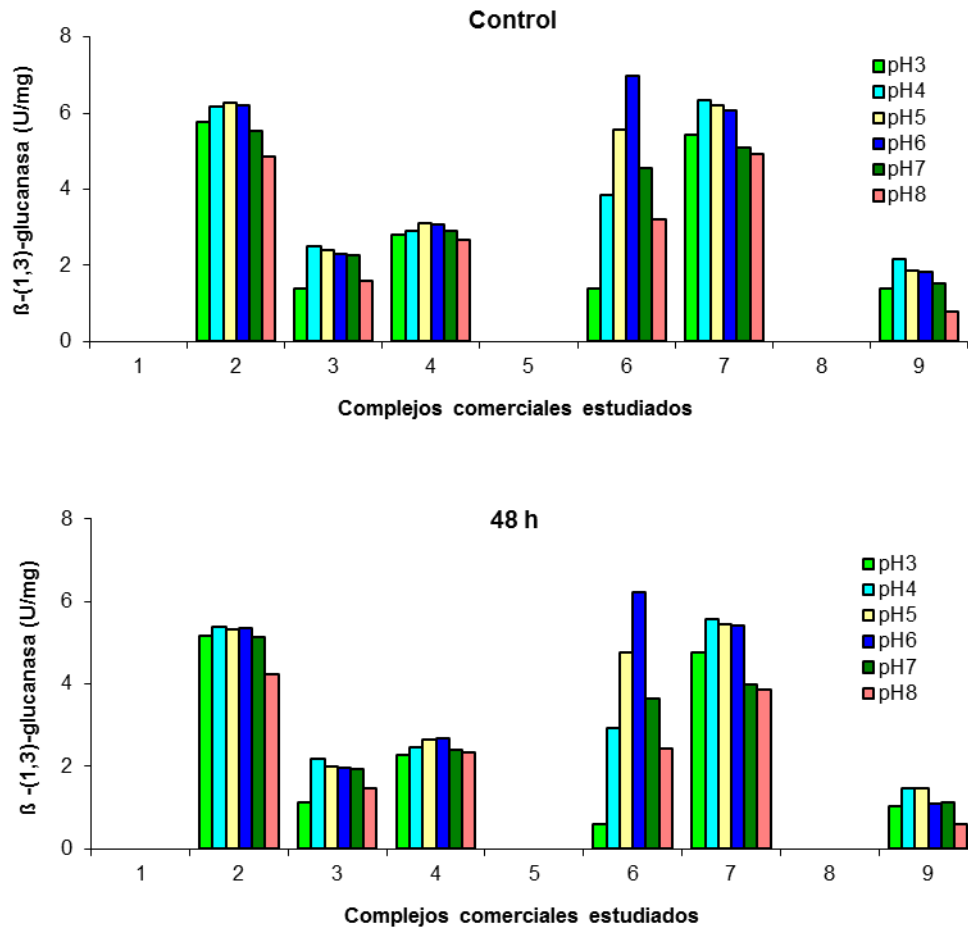


**Fig. 3.26.** Estabilidad a distintos pH de la actividad avicelasa en los cócteles 2, Liquozyme, 3, Spirizyme Fuel, 4, Viscozyme Barley, 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye, y 8, Celluclast.

### Actividad $\beta$ -(1,3)-glucanasa

Esta actividad fue muy estable a todos los valores de pH estudiados. Destacar la gran estabilidad del cóctel 2, Liquozyme, con actividad  $\alpha$ -amilasa, que mantuvo aproximadamente el 85% de actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa a lo largo de todo el rango de pH valorado (**Fig. 3.27**). El cóctel 6, Ultraflo, con actividad endoglucanasa, presentó también gran estabilidad a pH 5 y pH 6 (80% tras 48 h de incubación). Por último el cóctel 7, Viscozyme Rye, con actividad xilanasa y endoglucanasa, presentó también una estabilidad muy alta (85-90%) entre pH 3 y 6.

## Resultados



**Fig. 3.27.** Estabilidad a distintos pH de la actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa en los cócteles 2, Liquozyme, 3, Spirizyme Fuel, 4, Viscozyme Barley, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye y 9, Novozym 50010.

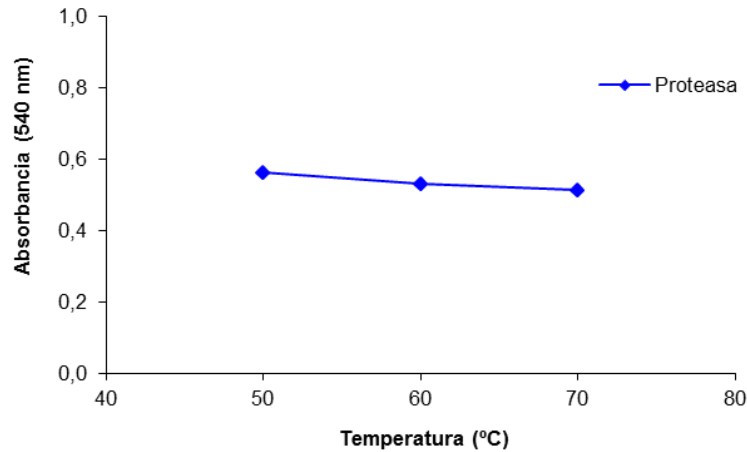
### 3.1.2.3 Estudios de la actividad frente a la temperatura

Las actividades se valoraron en tampón acetato 50 mM a pH 5 (apartado 2.4.4), a 50, 60 y 70 °C. Los resultados se describen a continuación y se expresan en unidades de absorbancia.

#### Cóctel 1, Alcalase

La determinación se realizó sobre azocaseína, sustrato utilizado para determinar la actividad proteasa, única actividad detectada en este cóctel. La **Figura 3.28**, muestra que la mayor hidrólisis de azocaseína tuvo lugar a 50 °C.

## Resultados

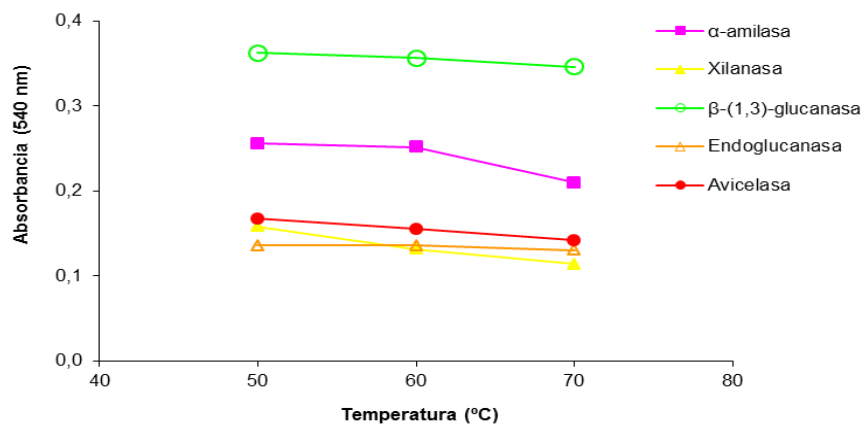


**Fig. 3.28.** Actividad vs temperatura del cóctel 1, Alcalase.

### Cóctel 2, Liquozyme

La actividad de este cóctel se valoró sobre: almidón soluble, xilano, laminarina, carboximetilcelulosa y avicel. Estos sustratos corresponden, respectivamente, a las actividades  $\alpha$ -amilasa, xilanasa,  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, endoglucanasa y avicelasa, actividades mayoritarias encontradas en este cóctel.

En la **Figura 3.29** se muestra la curva de temperatura para la actividad valorada en cada caso. Se observa en todos los casos mayor actividad entre 50 y 60 °C, disminuyendo a 70 °C, especialmente en el caso de la  $\alpha$ -amilasa.



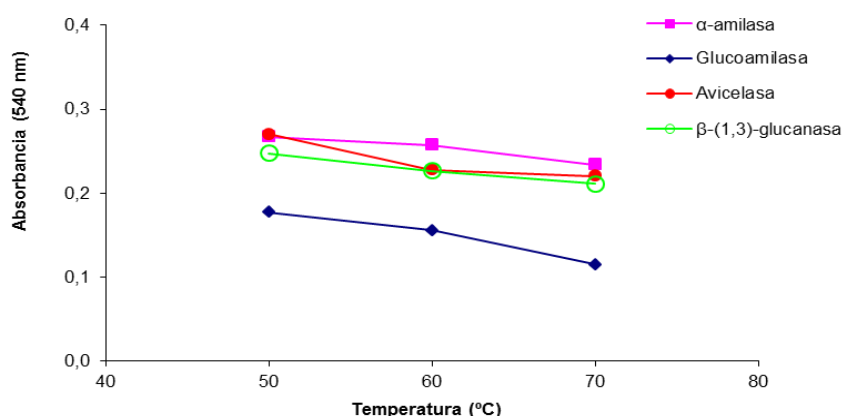
**Fig. 3.29.** Actividad vs temperatura del cóctel 2, Liquozyme.



### Cóctel 3, Spirizyme Fuel

Las actividades del cóctel 3, se valoraron sobre almidón, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, avicel y laminarina. Estos sustratos corresponden a las actividades mayoritarias encontradas en este complejo:  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa, avicelasa y  $\beta$ -(1,3)-glucanasa.

Las distintas actividades, en función de la temperatura, se muestran en la **Figura 3.30**. Todos los sustratos ensayados se hidrolizaron mejor a 50 °C.

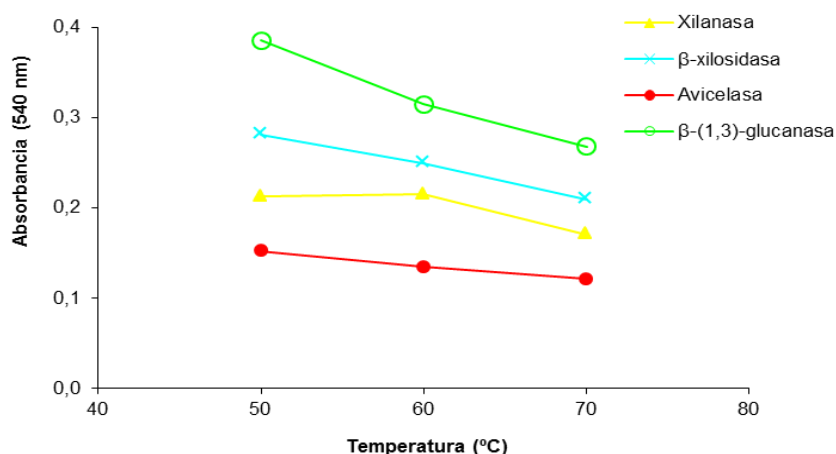


**Fig. 3.30.** Actividad vs temperatura del cóctel 3, Spirizyme Fuel.

### Cóctel 4, Viscozyme Barley

La actividad del cóctel 4 se valoró sobre: laminarina, xilano, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido y avicel. Estos sustratos corresponden a las actividades mayoritarias encontradas en este cóctel:  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, xilanasa,  $\beta$ -xilosidasa y avicelasa. La **Figura 3.31** muestra que todas las actividades fueron mayores a 50 °C aunque la xilanasa fue similar a 50 y 60 °C.

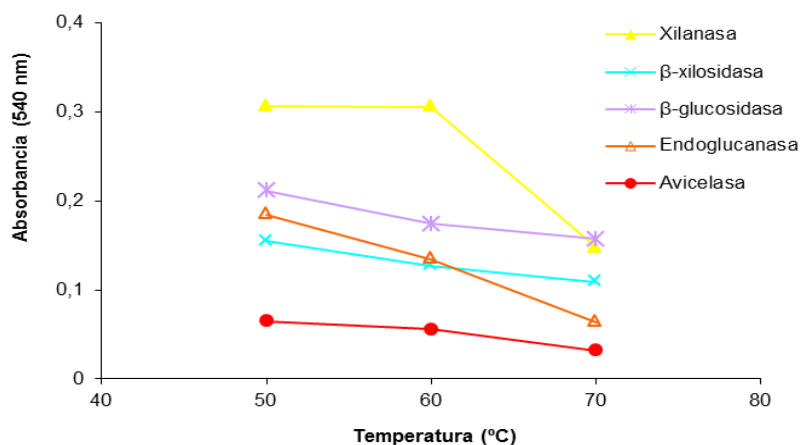
## Resultados



**Fig. 3.31.** Actividad vs temperatura del cóctel 4, Viscozyme Barley.

### Cóctel 5, Viscozyme Wheat

En el cóctel 5 se valoró la actividad sobre: *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosido, xilano, *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosido, carboximetilcelulosa y avicel. Estos sustratos corresponden a las actividades mayoritarias detectadas en este cóctel: β-xilosidasa, xilanasas, β-glucosidasa, endoglucanasa y avicelasa. En la **Figura 3.32** se observa como en este complejo la actividad xilanasas fue mayor entre 50 y 60 °C. El resto de las actividades valoradas fueron más altas a 50 °C. La actividad de la xilanasas y la endoglucanasa fue mucho menor a 70 °C.

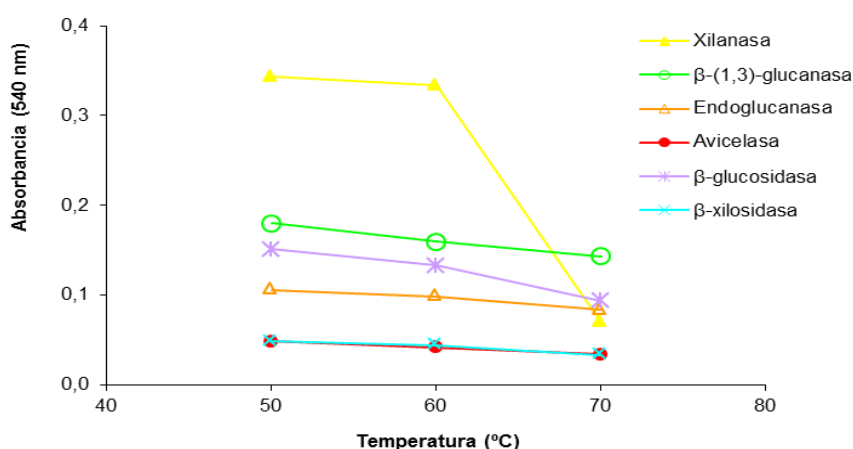


**Fig. 3.32.** Actividad vs temperatura del cóctel 5, Viscozyme Wheat.

### Cóctel 6, Ultraflo

El cóctel 6 se valoró sobre: laminarina, xilano, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido, carboximetilcelulosa, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido y avicel. Estos sustratos corresponden a las actividades mayoritarias encontradas en este cóctel:  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, xilanasa,  $\beta$ -xilosidasa, endoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa y avicelasa.

Este complejo, tal y como se observa en la **Figura 3.33**, presentó mayor actividad entre 50 y 60 °C, para todas las actividades valoradas. Destacar que, tal y como ocurría en el cóctel anterior, la actividad xilanasa presentó una bajada brusca de actividad a 70° C.



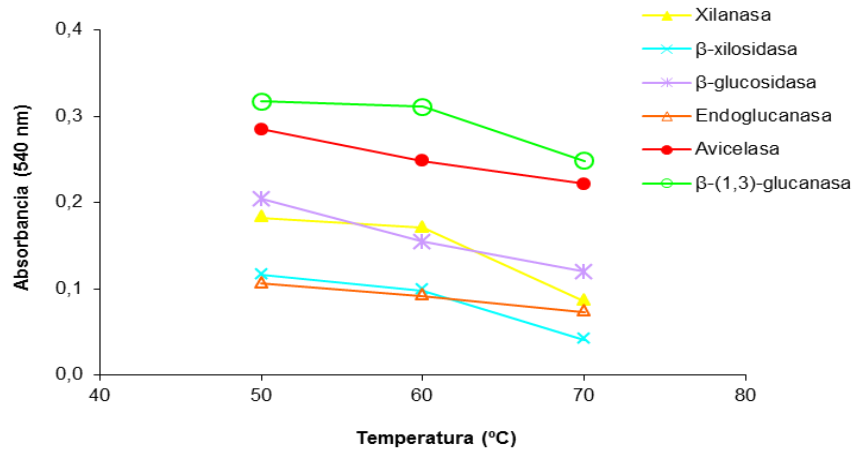
**Fig. 3.33.** Actividad vs temperatura del cóctel 6, Ultraflo.

### Cóctel 7, Viscozyme Rye

El cóctel 7 se valoró sobre: carboximetilcelulosa, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido, xilano, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, avicel y laminarina. Estos sustratos corresponden a las actividades mayoritarias encontradas en este cóctel: endoglucanasa,  $\beta$ -xilosidasa, xilanasa,  $\beta$ -glucosidasa, avicelasa y  $\beta$ -(1,3)-glucanasa.

Este complejo presentó, tal y como se observa en la **Figura 3.34**, también mayor actividad a 50 °C.

## Resultados

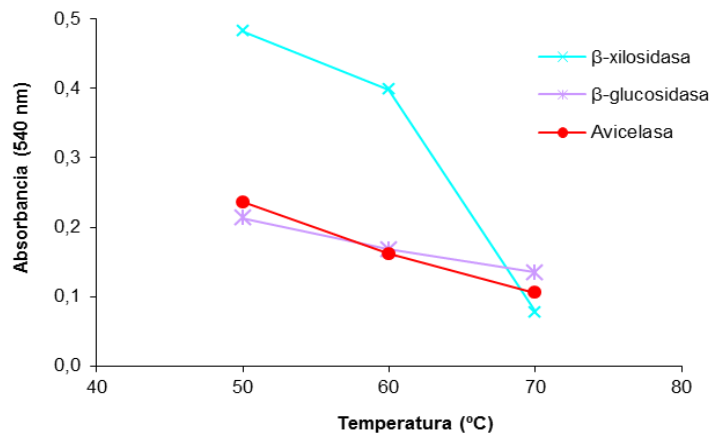


**Fig. 3.34.** Actividad vs temperatura del cóctel 7, Viscozyme Rye.

### Cóctel 8, Celluclast

La actividades del cóctel 8 se determinaron sobre: *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosido, avicel y *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosido, sustratos de actividades mayoritarias encontradas en este cóctel comercial: β-xilosidasa, avicelasa y β-glucosidasa respectivamente.

En la **Figura 3.35** se observa como la actividad de este complejo va decayendo a medida que aumenta la temperatura, siendo la actividad mucho más alta a 50 °C en todas las actividades valoradas.

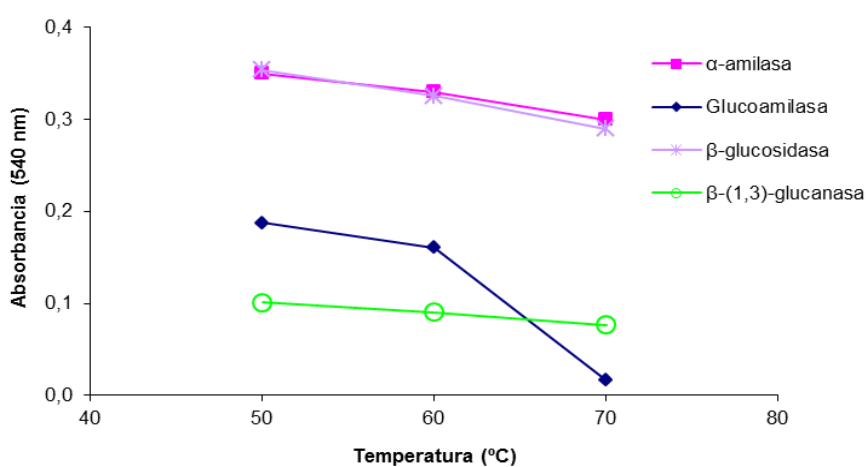


**Fig. 3.35.** Actividad vs temperatura del cóctel 8, Celluclast.

Cóctel 9, Novozym 50010

Las actividades en el cóctel 9 se valoraron sobre: almidón, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido y laminarina, sustratos de las actividades mayoritarias encontradas en este cóctel:  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -(1,3)-glucanasa.

La **Figura 3.36** muestra como este complejo presentó una mayor capacidad de hidrólisis a 50 °C, aunque la mayoría de las actividades valoradas, excepto la glucoamilasa, mostraron actividades similares a 60 °C.



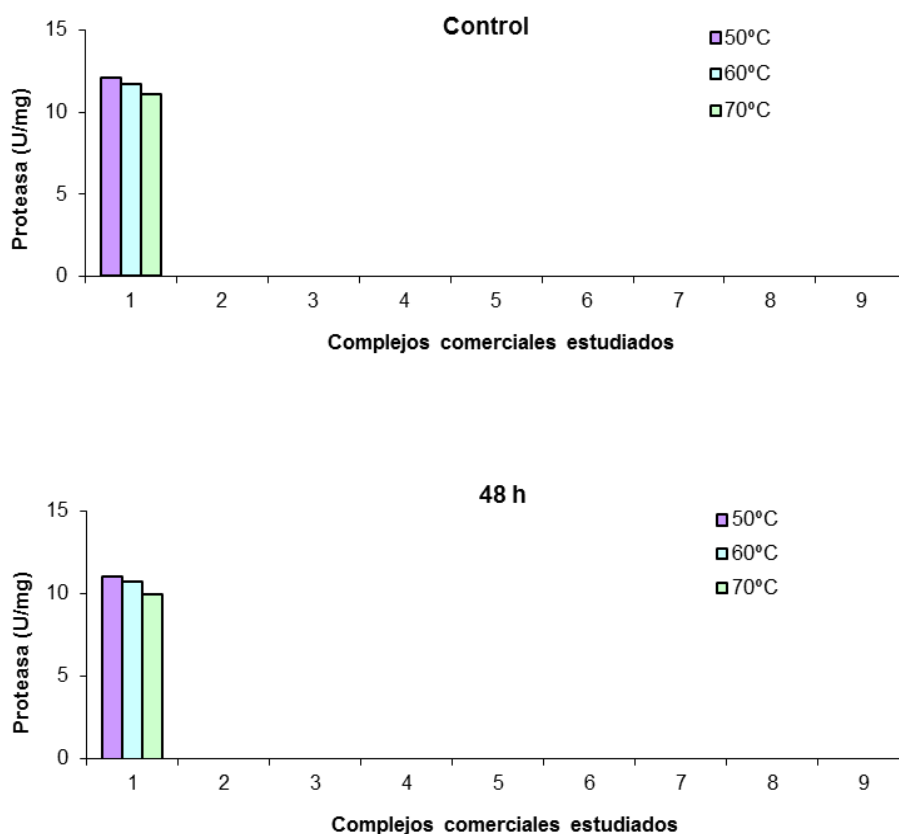
**Fig. 3.36.** Actividad vs temperatura del cóctel 9, Novozym 50010.

### 3.1.2.4 Estabilidad a la temperatura de los complejos enzimáticos

La estabilidad a la temperatura se ensayó a 50, 60 y 70 °C, en tampón acetato 50 mM a pH 5, tras 4, 8, 24 y 48 h de incubación (apartado 2.4.4). Como en el ensayo de la estabilidad a pH se muestra, para facilitar la lectura, exclusivamente las gráficas a tiempo cero y tras 48 h de incubación de los distintos complejos, según la actividad valorada en cada caso.

#### Actividad proteasa

Como se observa en la **Figura 3.37**, la actividad proteasa se estudió solo en el cóctel 1, Alcalase. Esta actividad presentó gran estabilidad a 50, 60 y 70 °C, manteniendo en todos los casos el 90% de su actividad inicial tras 48 h de incubación.

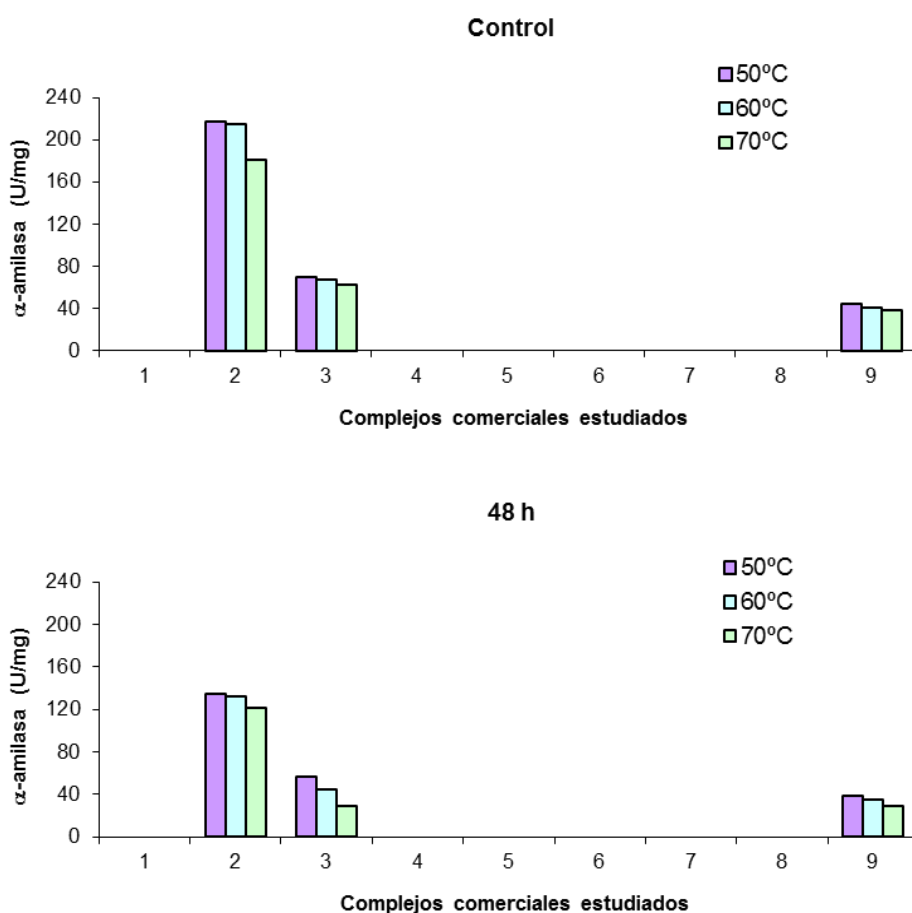


**Fig. 3.37.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad proteasa encontrada en el cóctel 1, Alcalase, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.

## Actividades amiláceas

### Actividad $\alpha$ -amilasa

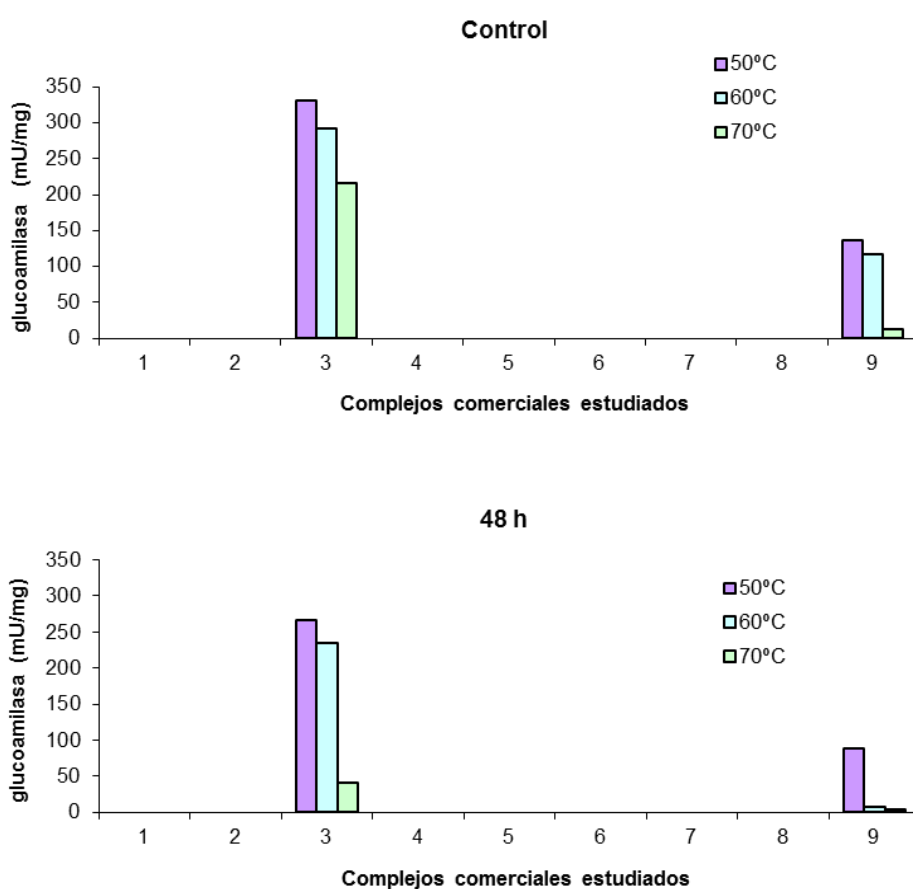
El cóctel 2, Liquozyme, cuya actividad  $\alpha$ -amilasa fue la principal y coincide con la descrita, presentó a todas las temperaturas ensayadas, alrededor del 60% de la actividad inicial tras 48 h de incubación (**Fig. 3.38**). En esta figura también se observa que el cóctel 3, Spirizyme Fuel, comercializado como glucoamilasa y el cóctel 9, Novozym 50010, con actividad  $\beta$ -glucosidasa, mostraron un 80 y 70%, respectivamente, de actividad  $\alpha$ -amilasa a 50 °C tras 48 h de incubación.



**Fig. 3.38.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad  $\alpha$ -amilasa encontrada en los cócteles 2, Liquozyme, 3, Spirizyme Fuel, y 9, Novozym 50010, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.

### Actividad glucoamilasa

La actividad en el cóctel 3, Spirizyme Fuel, descrita como glucoamilasa, presentó gran estabilidad a 50 y 60 °C, manteniendo hasta el 80% de actividad a ambas temperaturas, tras 48 h de incubación (**Fig. 3.39**). A 70 °C la capacidad de hidrólisis de este complejo disminuyó fuertemente (20%). En esta figura también se observa que en el cóctel 9, Novozym 50010, con actividad  $\beta$ -glucosidasa, la actividad glucoamilasa fue bastante estable a 50 °C, manteniendo un 65% del valor inicial, aunque esta actividad disminuye mucho a 60 °C, tras 48 h de incubación.



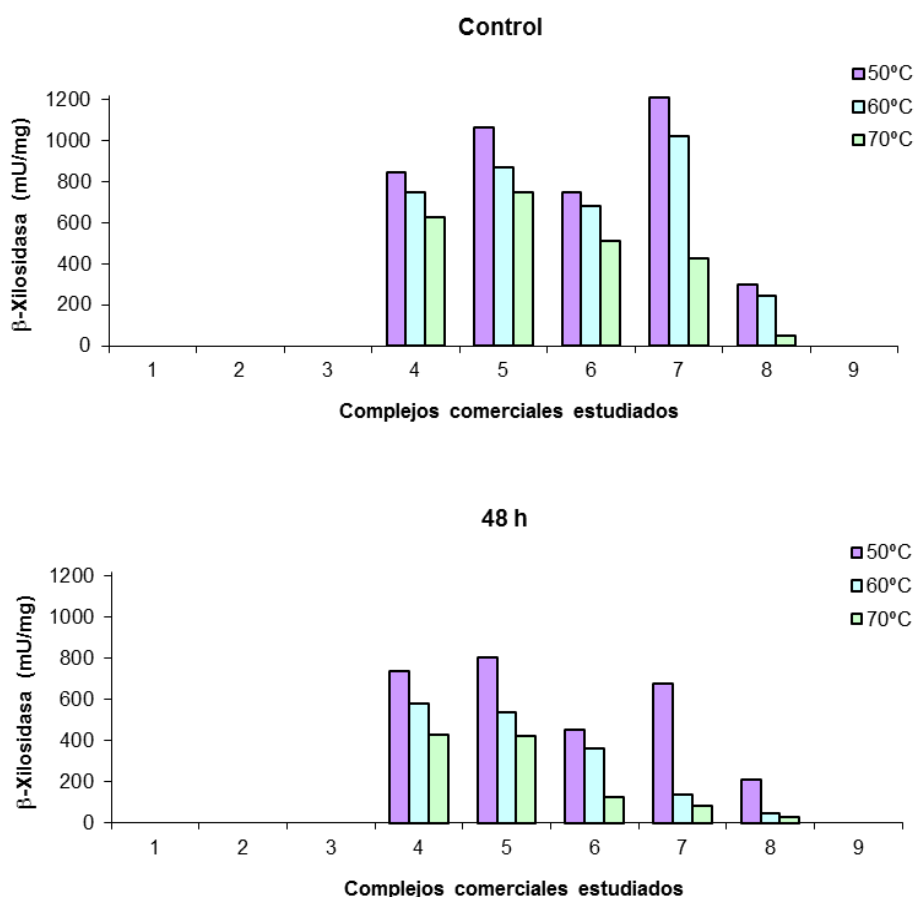
**Fig. 3.39.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad glucoamilasa encontrada en los cócteles 3, Spirizyme Fuel, y 9, Novozym 50010, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.



## Actividades xilanolíticas

### Actividad $\beta$ -xilosidasa

Tal y como se expuso en el apartado 3.1.1.3, esta actividad fue similar en los cócteles 5 y 7 xilanasa/endoglucanasa. Sin embargo, el cóctel 5 resultó ser más estable (75%), tras 48 h de incubación, que el cóctel 7 (50%) a 50 °C (**Fig. 3.40**). En esta figura también se observa que el cóctel 4, amilasa/celulasa, presentó una gran estabilidad a 50 °C y 60 °C manteniendo el 90 y 80% de esta actividad, respectivamente, tras 48 h de incubación. Destacar también que el cóctel 6, comercializado como endoglucanasa, mantuvo más del 50% de la actividad  $\beta$ -xilosidasa a 50 °C, tras 48 h de incubación.

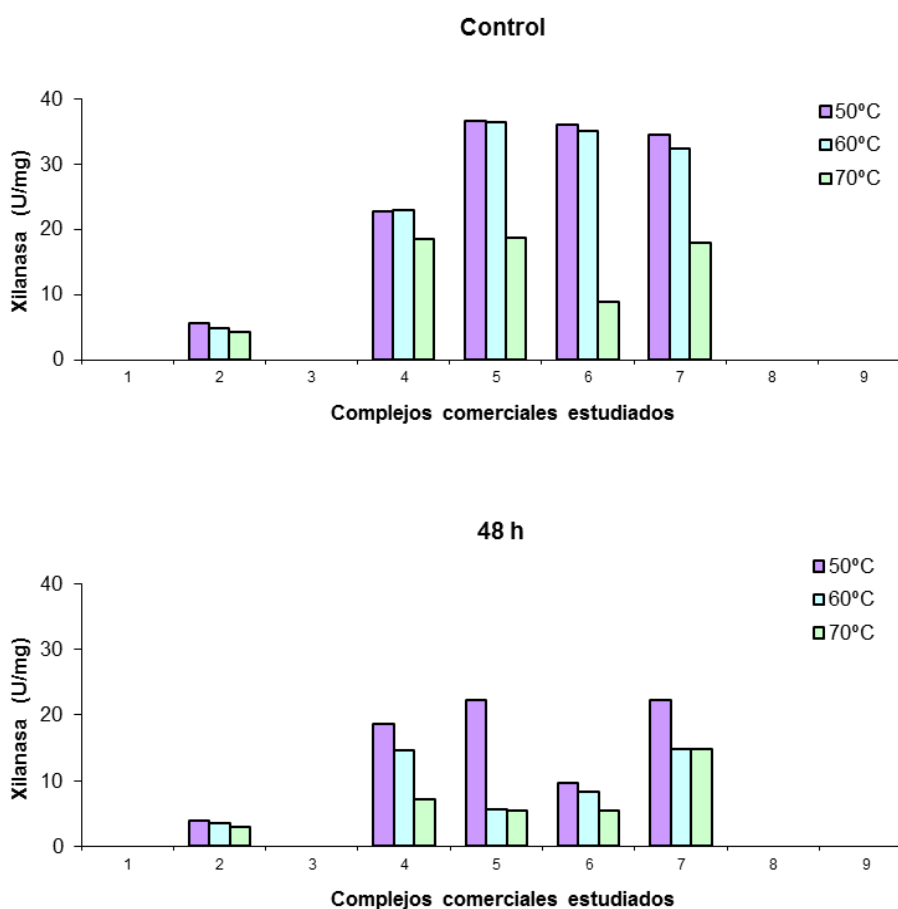


**Fig. 3.40.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad  $\beta$ -xilosidasa encontrada en los cócteles 4, Visczyme Barley, 5, Visczyme Wheat, 6, Ultraflo, 7, Visczyme Rye, y 8, Celluclast, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.

### Actividad xilanasa

La **Figura 3.41** muestra la estabilidad de los cócteles 5, Viscozyme Wheat, y 7, Viscozyme Rye, en ambos con actividades descritas xilanasa y endoglucanasa. A 50 °C, ambos conservaron un 60% de actividad xilanasa tras 48 h de incubación. Esta actividad disminuyó fuertemente en el cóctel 5, Viscozyme Wheat, a 60 °C (15%). Sin embargo, el cóctel 7, Viscozyme Rye, mostró a 60 °C y 70 °C, el 45 y 80%, respectivamente, de actividad xilanasa tras 48 h de incubación.

En cuanto a la estabilidad de la actividad xilanasa en el cóctel 6, Ultraflo, solo se detectó alrededor del 25% de la inicial tras 48 h de incubación, tanto a 50 como a 60 °C. Finalmente, en esta figura también se observa que el cóctel 4, Viscozyme Barley, con actividades amilasa y celulasa, tiene un 60% menos de actividad xilanasa inicial, aunque es bastante estable tanto a 50 como a 60 °C (80% y el 60% de la actividad tras 48 h de incubación, respectivamente).



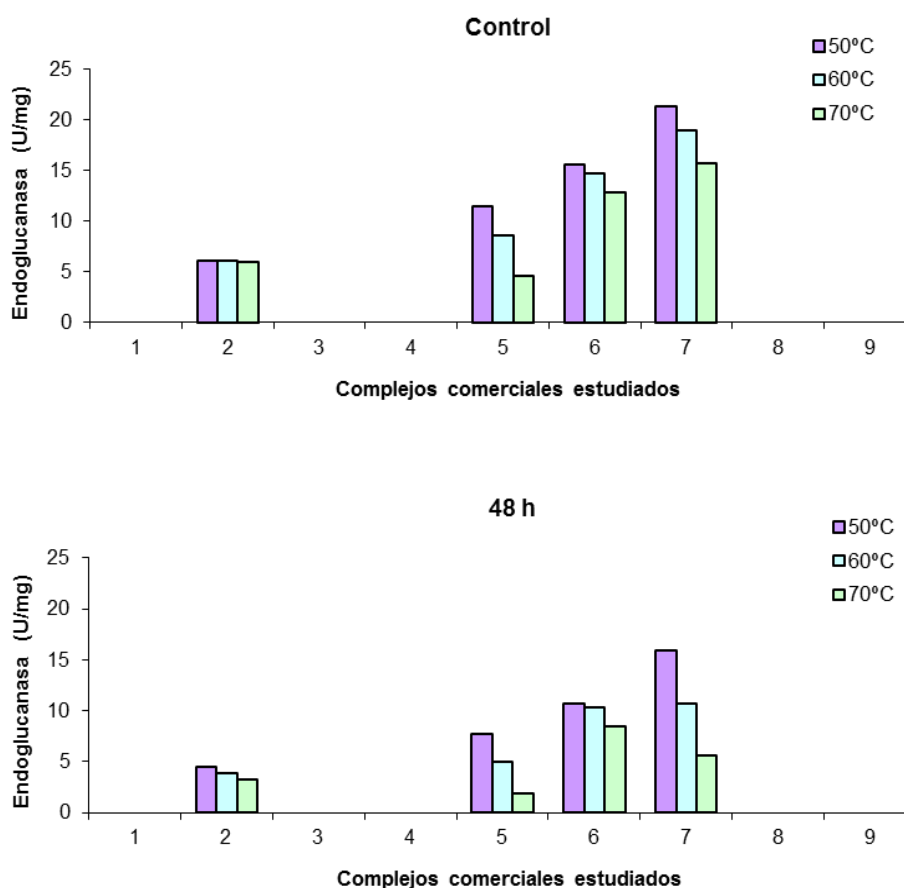
**Fig. 3.41.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad xilanasa encontrada en los cócteles 2, Liquozyme, 4, Viscozyme Barley, 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.

## Actividades celulolíticas

### Actividad endoglucanasa

En la **Figura 3.42** se observa que el cóctel 6, Ultraflo, con actividad endoglucanasa, destacó por su alta estabilidad en todo el rango de temperaturas estudiadas, manteniendo en todas ellas una capacidad de hidrólisis en torno al 70% tras las 48 h de incubación. Los cócteles 5, Viscozyme Wheat, y 7, Viscozyme Rye, ambos con actividades xilanasas y endoglucanasa, también mantuvieron el 70% y 75% de su actividad, respectivamente, a 50 °C. A 60 °C estos cócteles mantuvieron el 60% de su actividad endoglucanasa inicial, disminuyendo esta 70 °C (40% tras 48 h de incubación, en ambos casos).

Finalmente, la actividad endoglucanasa del cóctel 2, como puede observarse también en esta figura, presentó mayor estabilidad a 50 °C.

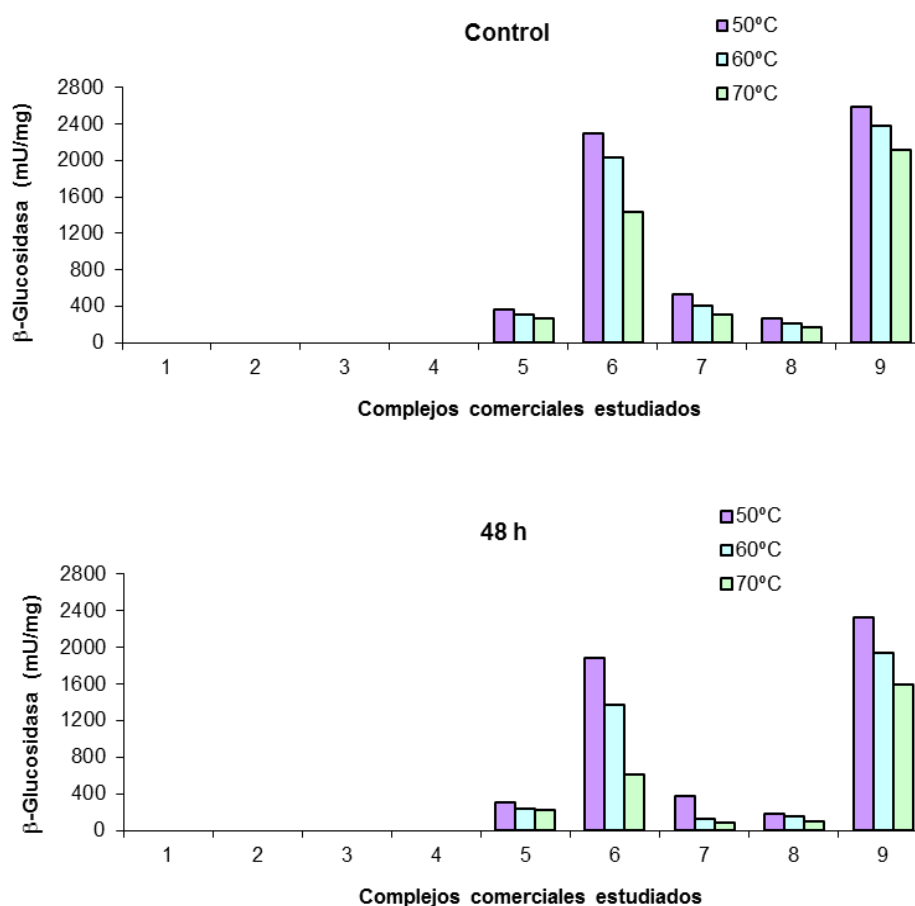


**Fig. 3.42.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad endoglucanasa encontrada en los cócteles 2, Liquozyme, 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.

### Actividad $\beta$ -glucosidasa

El cóctel 9, Novozym 50010, en el que está descrita esta actividad, presentó una gran estabilidad a todas las temperaturas estudiadas ya que mantuvo el 90, 80 y 75% de la actividad inicial a 50, 60 y 70 °C, respectivamente, tras 48 h de incubación (**Fig. 3.43**).

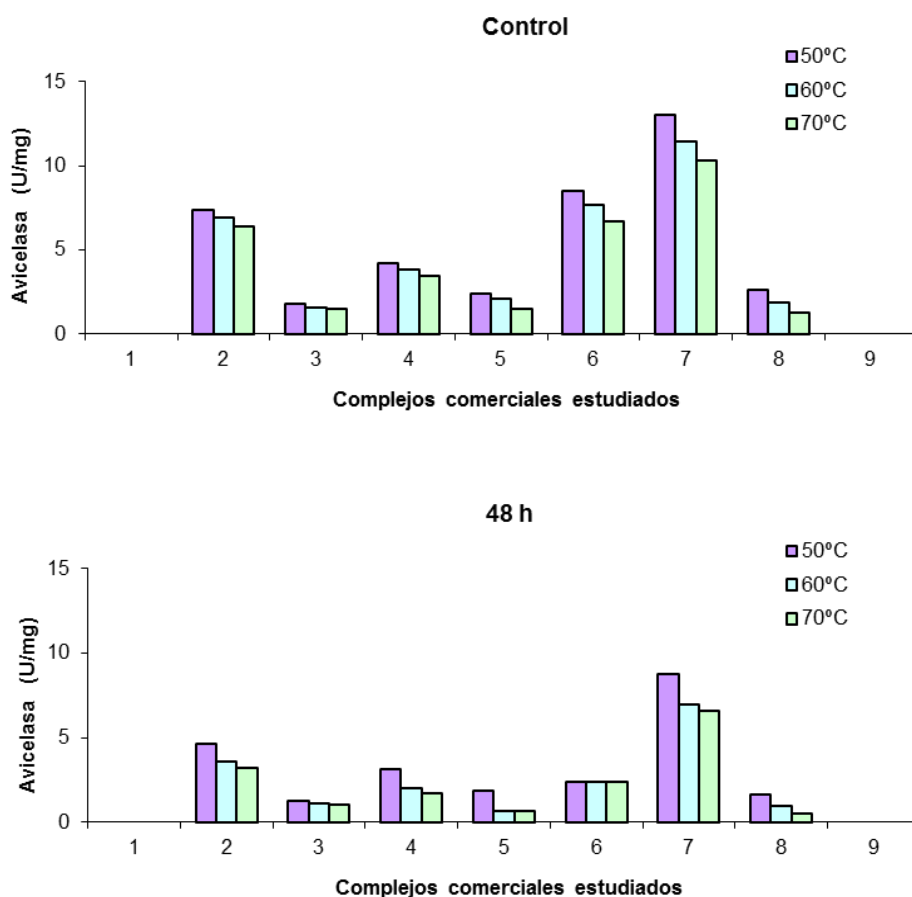
También en esta figura se observa que el cóctel 6, Ultraflo, con actividad endoglucanasa, presentó una alta estabilidad de su actividad  $\beta$ -glucosidasa ya que mantuvo alrededor del 80 y 70% de su actividad a 50 y 60 °C, respectivamente. A 70 °C la actividad disminuyó hasta el 40%. Todos los complejos estudiados con esta actividad fueron más estables a 50 °C.



**Fig. 3.43.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad  $\beta$ -glucosidasa encontrada en los cócteles 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye, 8, Cellucast, y 9, Novozym 50010, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.

### Actividad avicelasa o celulasa total

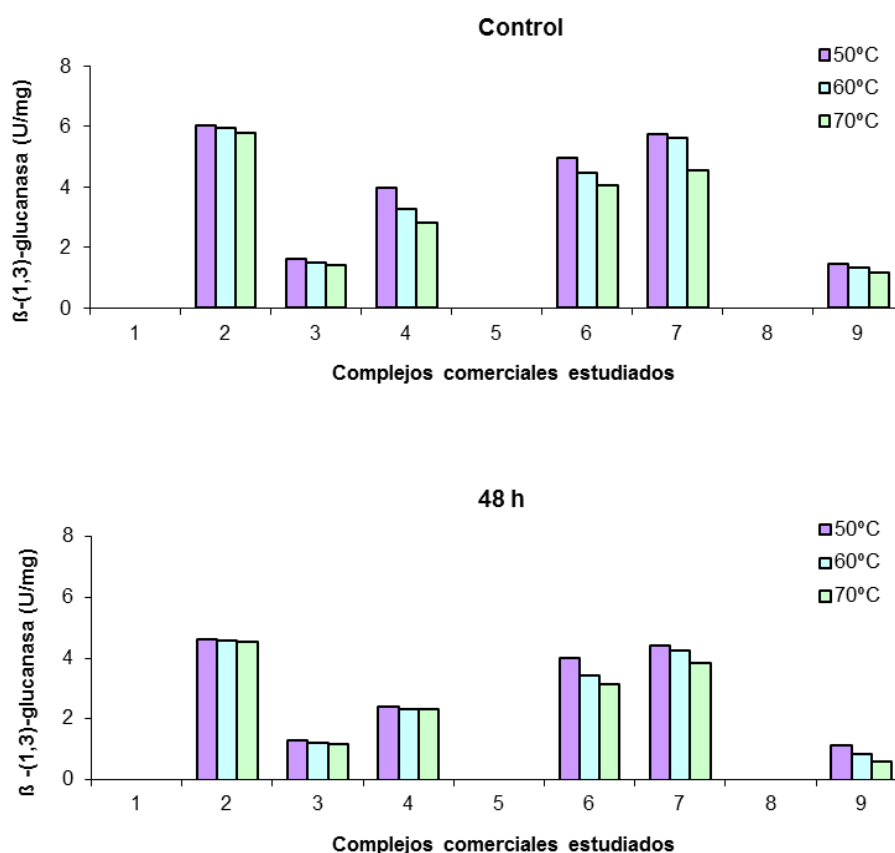
En la **Figura 3.44** se observa la estabilidad de la actividad avicelasa. En el cóctel 7, Viscozyme Rye, en el que están descritas las actividades xilanasa y endoglucanasa, la actividad avicelasa, tras 48 de incubación, se mantuvo en torno al 60% en todo el rango de temperaturas estudiadas. Los complejos descritos con actividad celulasa, como el cóctel 4, Viscozyme Barley, y 8, Celluclast, presentaron gran estabilidad a 50 °C, manteniendo aproximadamente el 70% de su actividad inicial. El cóctel 4 mostró a 60 y 70 °C una actividad en torno al 50%, pero esta fue menor en el cóctel 8 (alrededor del 40%). En el caso del cóctel 2, Liquozyme, con actividad  $\alpha$ -amilasa, la estabilidad de la actividad avicelasa también disminuyó al aumentar la temperatura y el tiempo de incubación.



**Fig. 3.44.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad avicelasa encontrada en los cócteles 2, Liquozyme, 3, Spirizyme Fuel, 4, Viscozyme Barley, 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye, y 8, Celluclast, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.

### Actividad $\beta$ -(1,3)-glucanasa

La actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa destacó en los cócteles 2, Liquozyme, con actividad  $\alpha$ -amilasa, 6, Ultraflo, con actividad endoglucanasa, y 7, Viscozyme Rye, con actividad xilanasa y endoglucanasa. Estos complejos fueron muy estables a 50 y 60 °C, manteniendo aproximadamente el 80% de la actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa tras 48 h de incubación (**Fig. 3.45**). El resto de los cócteles, mantuvieron una actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa similar (en torno al 80% de su actividad inicial a 70 °C).



**Fig. 3.45.** Estabilidad a distintas temperaturas de la actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa encontrada en los cócteles 2, Liquozyme, 3, Spirizyme Fuel, 4, Viscozyme Barley, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye y 9, Novozym 50010, a tiempo cero (control) y tras 48 h de incubación.



### **3.2 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE TRIGO Y CEBADA**





En este apartado se presentan los resultados de caracterización de los componentes del grano de trigo y cebada, materias primas generalmente utilizadas en España para obtener bioetanol 1G. A continuación, se describen los resultados de forma detallada, haciendo referencia a los que se obtienen de las distintas fracciones de la materia prima (esquema del apartado 2.5.1).

### 3.2.1 PESO SECO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LAS HARINAS

Para facilitar el análisis de los componentes de las harinas integrales, se realizaron extracciones sucesivas con agua fría y caliente, separando tres fracciones distintas. En la **Tabla 3.2** se muestra el porcentaje en peso seco que representa cada una de las fracciones analizadas (SF, SQ y R), respecto a la cantidad inicial de harina integral de trigo o cebada. Como se puede observar, la fracción SQ, que corresponde al material soluble en agua caliente, representó un porcentaje similar en la harina de los dos cereales (alrededor del 60%). La proporción en la fracción R, correspondiente al material insoluble, fue mayor en la harina de cebada, mientras que la fracción SF, que corresponde al material soluble en agua fría, fue más abundante en la harina de trigo.

**Tabla 3.2.** Peso seco (%) de las fracciones SF, SQ y R obtenidas a partir de harina integral de trigo y de cebada.

Cereal	SF	SQ	R
Trigo	27,9	62,6	9,3
Cebada	12,6	66,6	20,3

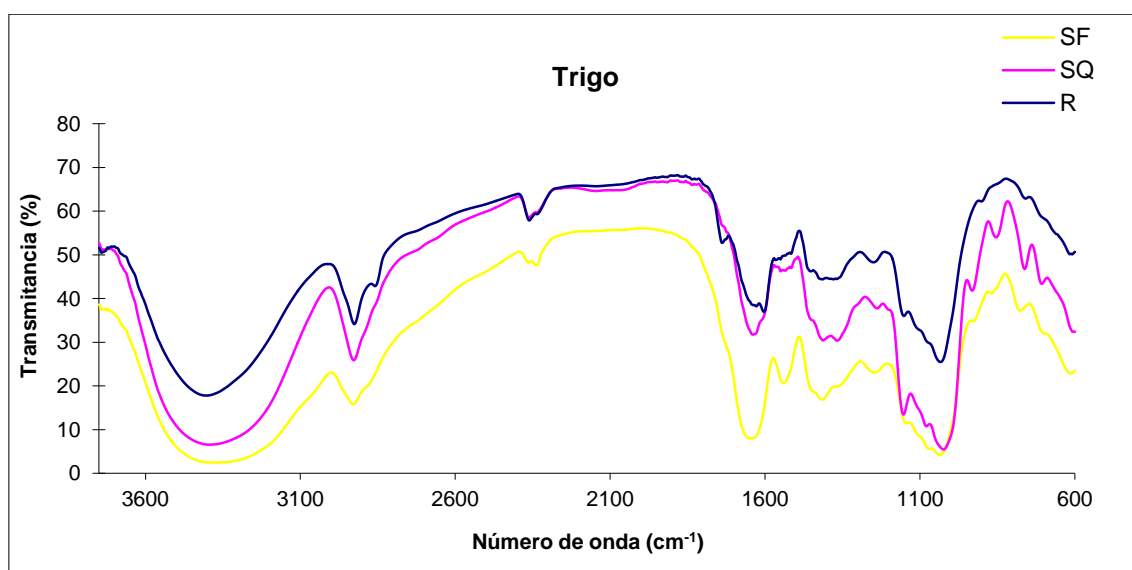
### 3.2.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE LAS DIFERENTES FRACCIONES

El análisis mediante espectroscopía infrarroja (apartado 2.5.2) permitió obtener una visión general de los componentes de las fracciones. Todos los espectros presentaron bandas de absorción típicas de carbohidratos en la región comprendida entre 800 y 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas a 1560 y

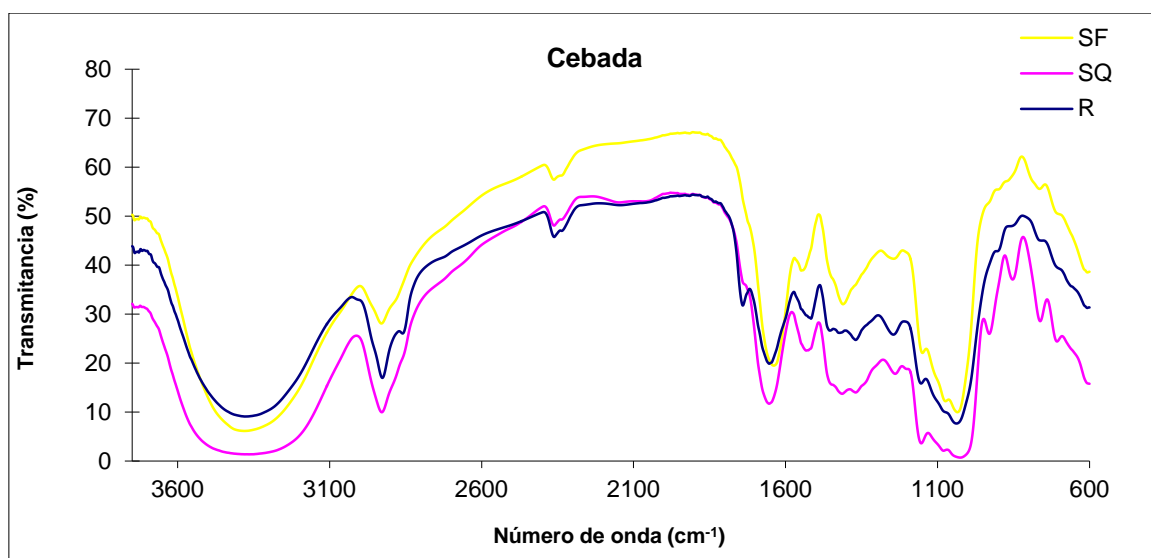
1650  $\text{cm}^{-1}$  son propias del enlace amida y pueden atribuirse a la presencia de proteínas.

La **Figura 3.46** muestra los espectros de IR de las fracciones del trigo. En la fracción SF se observan bandas a 850 y 930  $\text{cm}^{-1}$  características de anómeros  $\alpha$ , probablemente debidas a la presencia de cadenas cortas de almidón soluble (Mathlouthi y Koenig, 1987). La banda poco intensa a 897  $\text{cm}^{-1}$ , es típica de anómeros en configuración  $\beta$  y puede indicar que esta fracción contiene  $\beta$ -glucanos y/o  $\beta$ -xilano de la pared celular del endospermo, ya que una cierta proporción de los arabinoxilanos de pared son solubles en agua (Robert et al., 2005). En la fracción SQ se observan bandas a 850, 930 y 1018  $\text{cm}^{-1}$  características del almidón (Kacuráková and Wilson, 2001). En el residuo R se detectaron bandas a 895  $\text{cm}^{-1}$  y 1037  $\text{cm}^{-1}$  características de  $\beta$ -(1,4)-glucanos como la celulosa (Robert et al., 2005), y otra poco intensa a 1730  $\text{cm}^{-1}$  debida a la presencia de grupos carboxilo, probablemente ácido galacturónico procedente de las sustancias pécticas vegetales. Esta fracción debe contener principalmente las cubiertas del grano que constituyen el salvado, formado por fibra (celulosa, hemicelulosa y pectina).

Los espectros de IR de las fracciones de cebada se muestran en la **Figura 3.47** y presentan prácticamente el mismo perfil que en el trigo, lo que indica que tienen una composición similar.



**Fig. 3.46.** Espectros de IR de las fracciones SF, SQ y R de trigo.



**Fig. 3.47.** Espectros de IR de las fracciones SF, SQ y R de cebada.

### 3.2.3 CONTENIDO EN PROTEÍNAS DE LAS HARINAS

Se valoró el contenido proteico de las muestras de harina y sus fracciones SF, SQ y R (apartado 2.5.4). La harina de trigo resultó ser más rica en proteínas (17,7%). En la **Tabla 3.3** se muestran los resultados obtenidos, cuyo rango es comparable a los valores descritos previamente por otros autores (Primo, Y. E., 1982; Bekes et al., 2004).

En cuanto al contenido proteico de las fracciones, la mayor proporción de proteínas se detectó en las fracciones extraídas en agua fría (SF), tanto en trigo como en cebada. Esta fracción debe contener la mayoría de las proteínas solubles en agua, de modo que en las fracciones SQ (que también se obtiene mediante extracción acuosa), quedaría solo una cantidad residual de dichas proteínas.

El resto de las proteínas contenidas en las harinas se deben encontrar en el residuo (R) y este valor se calculó por diferencia entre el contenido total y el de las fracciones de la harina (SF+SQ).

**Tabla 3.3.** Contenido de proteína (%) de la harina y sus fracciones en trigo y cebada.

Fracción	Trigo	Cebada
SF	16,8	8,5
SQ	0,6	1,9
R	1,0	1,7
Harina	17,7	10,7

### 3.2.4 CONTENIDO EN LIGNINA DE LAS HARINAS

En la fracción residual sólida (R), se determinó el contenido en lignina Klason (apartado 2.5.5). Los resultados indican que este componente de la pared celular vegetal es muy minoritario, tanto en el grano integral de trigo como en el de cebada, apareciendo en sus harinas integrales solo trazas de este heteropolímero. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por otros autores (Primo, Y. E., 1982; Oscarsson et al., 1996).

### 3.2.5 CONTENIDO EN AZÚCARES DE LAS HARINAS

El grano de cereal contiene tanto azúcares libres como oligo- y polisacáridos. Se valoraron los carbohidratos totales en las muestras de harina de trigo y cebada siguiendo el método del fenol-sulfúrico, descrito en el apartado 2.5.3. Los resultados obtenidos tras el análisis mostraron un mayor porcentaje de azúcares en la harina de trigo (70%) que en cebada (62%). Estos datos coinciden también con los descritos en la literatura (Oscarsson et al., 1996; Cui y Wang, 2009). El componente principal del grano de los cereales es el almidón, sustancia de reserva compuesta por dos polímeros de D-glucosa: amilosa, formada por cadenas lineales unidas mediante enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4), y amilopectina con cadenas de  $\alpha$ -(1,4)-glucosa parcialmente ramificadas en  $\alpha$ -(1,6) (Copeland et al., 2009). Además, la pared celular del endospermo del grano contiene un  $\beta$ -(1,3)(1,4)-D-glucano, (comúnmente llamado  $\beta$ -glucano), arabinoxilanos y una pequeña cantidad de celulosa y lignina (Oscarsson et al., 1996; Li et al., 2006).

Puesto que los azúcares libres deben solubilizarse con la primera extracción acuosa, solo se determinó la composición en monosacáridos

libres en las fracciones SF de ambas harinas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5.6. Los resultados se muestran en la **Tabla 3.4**.

**Tabla 3.4.** Monosacáridos libres (%) en la fracción SF de las harinas.

Cereal	Arabinosa	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glucosa
<b>Trigo</b>	-	-	1,6	6,3	15,2
<b>Cebada</b>	1,1	0,4	0,3	7,4	3,8

El monosacárido mayoritario en el trigo es la glucosa, mientras que en la cebada es la galactosa. Además, se puede observar que la harina de trigo contiene mayor proporción de monosacáridos solubles que la de cebada.

También se analizó la composición de los polisacáridos extraídos en las fracciones SF, SQ y R. En la **Tabla 3.5** se resume los resultados de la hidrólisis de las distintas fracciones en ambas harinas. Estos análisis pusieron de manifiesto que en la fracción SF hay una pequeña proporción de glucanos, tanto en trigo como en cebada, (aproximadamente un 27-28%). La hidrólisis de la fracción SQ liberó alrededor de un 67% de glucosa en ambas harinas. Esta fracción debe contener, como se ha descrito en trabajos anteriores, el almidón del endospermo de los granos de ambos cereales (Xie et al., 2008; Copeland et al., 2009). En el residuo sólido R de los dos tipos de harina, se detectó en torno al 13% de glucosa y una mayor proporción de xilosa y arabinosa que en las otras fracciones estudiadas, en las que mayoritariamente se obtuvo glucosa. Estos datos corroboran que el residuo R contiene los polisacáridos que constituyen la fibra del salvado de cereales.

En general, podemos decir que la composición en azúcares de ambas materias primas es muy similar. Se ha podido constatar el alto porcentaje de azúcares fermentables presentes en los granos de trigo y cebada (más azúcares libres en trigo y semejante porcentaje de almidón) y que en ambos casos la lignina es una fracción residual.

**Tabla 3.5.** Monosacáridos (%) liberados tras la hidrólisis de las diferentes fracciones en las harinas de trigo y cebada.

Fracciones	Cereal	Arabinosa	Xilosa	Galactosa	Glucosa
<b>SF</b>	<b>Trigo</b>	1,3	2,2	2,2	26,9
	<b>Cebada</b>	2,1	1,9	-	28,8
<b>SQ</b>	<b>Trigo</b>	-	-	-	67,1
	<b>Cebada</b>	3,8	-	-	67,0
<b>R</b>	<b>Trigo</b>	10,4	15,0	-	13,3
	<b>Cebada</b>	6,3	14,2	1,9	13,9

### 3.2.6 CONTENIDO EN ÁCIDOS URÓNICOS DE LAS HARINAS

La determinación de ácidos urónicos (apartado 2.5.8) puso de manifiesto la presencia de trazas de ácido galacturónico, componente de las pectinas de vegetales, en el residuo (fracción R) de las harinas integrales de trigo y cebada, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente por otros autores (Fontaine et al., 1994).

### 3.2.7 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS POLISACÁRIDOS DE LAS FRACCIONES DE HARINA DE CEREAL

Los tipos de enlace característicos de los polisacáridos se dedujeron a partir del análisis de metilación de dichas fracciones. Esta técnica consiste en la obtención de los acetatos de alditol, parcialmente metilados, de los polisacáridos y el posterior análisis de estos derivados mediante GC-MS (apartado 2.5.7).

Harina de trigo: La identificación y cuantificación de los principales tipos de enlace de los polisacáridos se presenta en la **Tabla 3.6**. Todas las fracciones contienen mayoritariamente unidades de glucosa unida mediante enlaces (1,4). Este tipo de unidades pueden proceder del almidón del endospermo del grano o de la celulosa de sus paredes celulares vegetales.

**Tabla 3.6.** Tipos de enlace (%) deducidos del análisis de metilación de los polisacáridos de la harina de trigo.

TR (min)	Tipo de enlace	Fragmentos característicos (m/z)	Proporciones relativas (%)		
			SF	SQ	R
4,60	Xilp-(1→	101, 102, 117, 118,161,162	5,1	-	-
5,99	→4)-Xilp-(1→	87,88,102,118,129,130,189	29,7	-	20,7
6,69	Glc p-(1→	87,88,102,118,129,161,205	10,9	2,9	2,3
7,65	→3)-Araf-(1→	88,89,129,130,189,190	3,9	-	4,5
7,70	→2,4)-Xilp-(1→	88,89,129,130,189,190	2,2	-	1,9
8,59	→2)-Manp-(1→	87, 88, 101, 129, 130, 161, 190	5,9	-	-
8,77	→3)-Glc p-(1→	101,118,129,161,234	-	-	3,0
8,98	→4)-Glc p-(1→	87,102,113,118,129,131,162,173,233	30,9	86,4	63,3
10,70	→3,4)-Glc p-(1→	118,129,305	-	4,8	1,8
11,89	→4,6)-Glc p-(1→	118,201,261	4,2	5,9	2,4
12,9	→3,6)-Glc p-(1→	118,129,189,174,234	6,9	-	-

En la fracción SF, además de (1,4)-glucosa (30,9%), se detectó xilosa, principalmente unida mediante enlaces (1,4) y cantidades menores de otros componentes, como (1,3)-arabinosa (Izydorczyk y Biliaderis, 1995), (1,2)-manosa y glucosa sustituida en las posiciones (1, 3 y 6).

En la fracción SQ más del 85% de la glucosa se encuentra formando una cadena lineal unida mediante enlaces (1,4), aunque una pequeña proporción de esta cadena está ramificada en su posición O-3 o O-6 por unidades terminales de glucosa. Estos datos, junto con los obtenidos mediante espectroscopía IR, revelaron la presencia de anómeros en configuración  $\alpha$  y la ausencia de anómeros  $\beta$  en esta fracción y coinciden con los esperados para el almidón.

En la fracción R se detectó más de un 60% de (1,4)-glucosa, alrededor de un 20% de (1,4)-xilosa y otros componentes minoritarios. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la composición monosacáridica. Los enlaces mayoritarios encontrados, presumiblemente son debidos a la celulosa contenida en esta fracción, ya que mediante el



análisis de espectroscopía infrarroja, (apartado 3.2.2), se dedujo la presencia de anómeros  $\beta$ . Otros tipos de enlace, detectados principalmente en las fracciones SF y R, son característicos de arabinoxilanos, que presentan una esqueleto principal del tipo (1,4)-xilosa, parcialmente ramificado en O-2, O-3 o incluso O-5 por arabinosa (Izydorczyk y Biliaderis, 1995).

Harina de cebada: Los resultados obtenidos tras la metilación (**Tabla 3.7**), mostraron que la cebada tiene menor porcentaje de (1,4)-xilosa en las fracciones SF y R (5% y 6% respectivamente). El componente mayoritario en todas las fracciones fue glucosa unida en enlaces (1,4) y, al igual que en la harina de trigo, procedería del almidón en la fracción SQ, de la celulosa y otros posibles  $\beta$ -glucanos en el residuo R, y de una mezcla de componentes en la fracción SF. Destacar también que en las fracciones SF y SQ se detectó respectivamente un 12% y un 1% de (1,3)-glucosa que revelan la presencia en las fracciones de cebada de otros glucanos, solubles en agua fría y diferentes al almidón y la celulosa. La fracción R contiene además un 2% de (1,4)-galactosa. Estos enlaces, propios de la harina integral de cebada, no se detectaron en la harina de trigo (Lazaridou et al., 2008).

**Tabla 3.7.** Tipos de enlace (%) deducidos del análisis de metilación de los polisacáridos de la harina de cebada.

TR (min)	Tipo de enlace	Fragmentos característicos (m/z)	Proporciones relativas (%)		
			SF	SQ	R
5,99	→4)-Xilp-(1→	87,88,102,118,129,130,189	5,2	-	6,5
6,69	Glc p-(1→	87,88,102,118,129,161,205	10,4	3,5	2,9
7,65	→3)-Araf-(1→	88,89,129,130,189,190	-	-	2,7
7,70	→2,4)-Xilp-(1→	88,89,129,130,189,190	-	-	1,6
8,77	→3)-Glc p-(1→	101,118,129,161,234	12,2	1,0	1,5
8,98	→4)-Galp-(1→	87,102,113,118,129,131,162,173,233	-	-	1,8
8,98	→4)-Glc p-(1→	87,102,113,118,129,131,162,173,233	62,3	90,5	80,6
10,70	→3,4)-Glc p-(1→	118,129,305	2,8	1,2	-
11,89	→4,6)-Glc p-(1→	118,201,261	6,9	3,7	2,3

### **3.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS DOSIS DE ENZIMAS NECESARIAS PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE GRANO DE TRIGO**



En este apartado se describen los resultados de los experimentos que se realizaron con diferentes cócteles comerciales para tratar de optimizar los complejos enzimáticos y las dosis de estos en la producción de bioetanol 1G a partir de harina de trigo integral (apartado 2.6).

A continuación se detallan los resultados obtenidos en las diferentes etapas del proceso de producción industrial (Mezcla, Licuefacción, Sacarificación y Fermentación) utilizando las enzimas convencionales y los nuevos complejos enzimáticos caracterizados en el primer apartado de este trabajo. El control, en todos los casos, corresponde a la harina tratada en las mismas condiciones, sin enzima añadida.

### 3.3.1 ETAPA DE MEZCLA

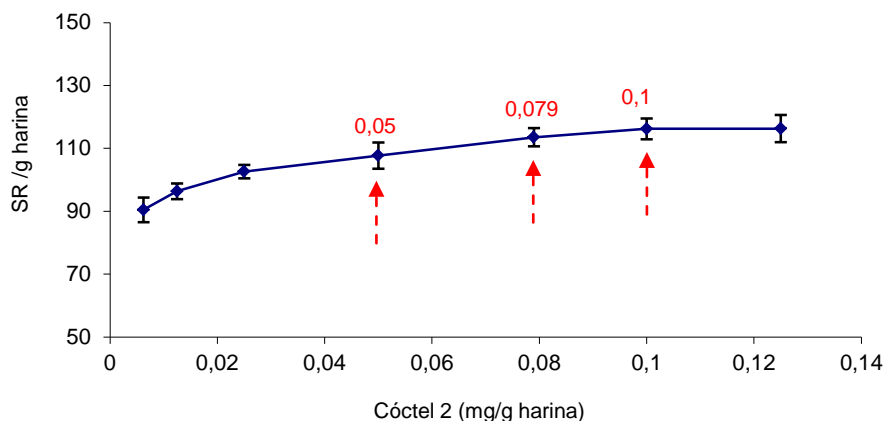
El **cóctel 2, Liquozyme**, comercializado como  $\alpha$ -amilasa, se utilizó en esta etapa en diferentes concentraciones (**Tabla 3.8**), y en las condiciones descritas en el apartado 2.6.1. Se escogió este cóctel porque fue el que mostró mayor actividad específica frente a almidón soluble y esta actividad es esencial para hidrolizar el almidón de los granos de cereales (apartado 3.1.1.2).

**Tabla 3.8.** Diferentes dosis del cóctel 2, Liquozyme, con actividad  $\alpha$ -amilasa usadas en el proceso de Mezcla.

Liquozyme	
mg /g harina	U /g harina
0,00625	2,2
0,01250	4,3
0,02500	8,6
0,05000	17,2
0,07900	27,2
0,10000	34,4
0,12500	43,0

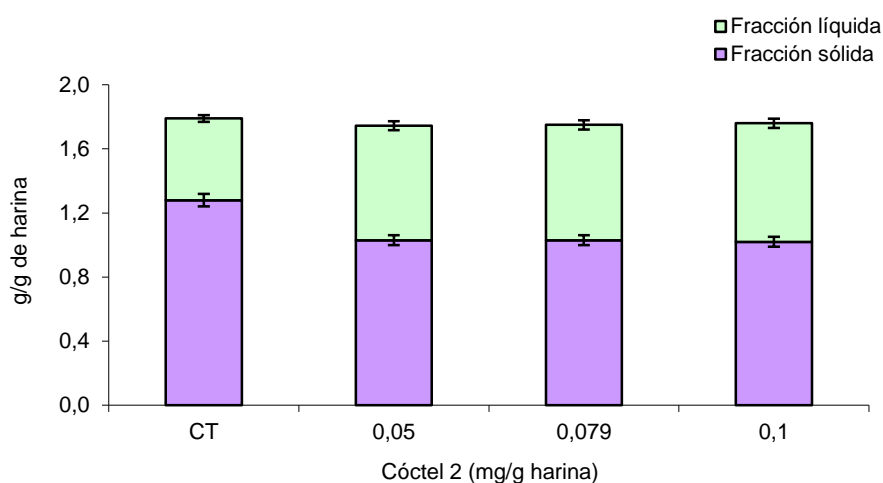
Las fracciones obtenidas tras el tratamiento se denominaron, mezcla líquida (m-LIQ) y mezcla sólida (m-SOLID). En la m-LIQ se analizaron, inicialmente los azúcares liberados, mediante el método de Somogyi y Nelson (**Fig. 3.48**), con el fin de conocer los azúcares libres que quedaban en ambas fracciones tras el tratamiento enzimático.

## Resultados



**Fig. 3.48.** Sustancias reductoras liberadas tras el tratamiento de la harina de trigo con distintas dosis de  $\alpha$ -amilasa.

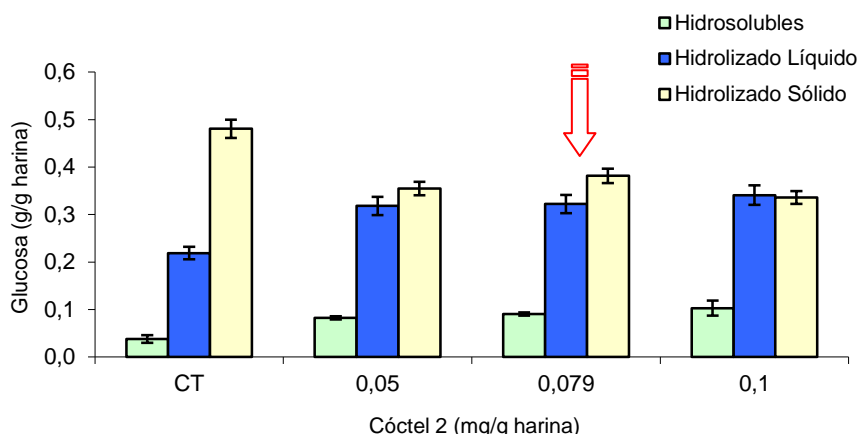
A la vista de los resultados (**Fig. 3.48**) se seleccionaron las tres dosis, señaladas con flechas, en las que se iba incrementando la liberación de azúcares hasta valores constantes. Se descartó la dosis mayor, por no incrementar la liberación de azúcares. Tras liofilizar las fracciones m-LIQ y m-SOLID se pesaron, para evaluar la diferencia en masa de estas fracciones tras la etapa de Mezcla con  $\alpha$ -amilasas (**Fig. 3.49**). Al comparar con el control, se observó cómo el peso de la fracción sólida disminuye, como cabría esperar, ya que las enzimas están solubilizando el almidón, y como consecuencia aumenta el de la fracción líquida. Sin embargo, no se ven diferencias significativas con las diferentes dosis de enzima utilizadas.



**Fig. 3.49.** Pesos obtenidos en la fracción líquida y sólida de la harina de trigo tras la etapa de Mezcla utilizando diferentes dosis de  $\alpha$ -amilasa.

Con el fin de estudiar más en detalle los azúcares liberados en esta etapa con las diferentes dosis de enzima ensayadas, las fracciones m-LIQ y m-SOLID se hidrolizaron y su composición monosacarídica se analizó por GC (apartado 2.5.6). En la fracción líquida, también se cuantificaron por GC los monosacáridos solubilizados en esta etapa (fracción líquida en la etapa de Mezcla, no hidrolizada, m-LIQ-NH) (**Fig. 3.50**). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que no existen diferencias significativas entre las distintas dosis de enzimas estudiadas. Sin embargo, en todas ellas puede observarse claramente un aumento importante de la glucosa liberada en la fracción hidrosoluble, respecto al control. Estos resultados corroboran los obtenidos previamente en el análisis de sustancias reductoras.

Para continuar los tratamientos, se decidió seguir con la dosis de  $\alpha$ -amilasa en mezcla de 0,079 mg/g harina, y probar cómo afectaba diferentes dosis de esta enzima en la etapa de Licuefacción.



**Fig. 3.50.** Contenido en glucosa de las fracciones m-LIQ-NH (hidrosolubles), m-LIQ (hidrolizado líquido) y m-SOLID (hidrolizado sólido), tras la etapa de Mezcla de la harina de trigo, utilizando diferentes dosis de  $\alpha$ -amilasa. La flecha indica la dosis seleccionada para estudios posteriores.

### 3.3.2 ETAPA DE LICUEFACCIÓN

En el apartado 2.6.2 se describe con detalle el procedimiento realizado en esta etapa (**Fig. 2.4**).

Una vez finalizada la etapa de Mezcla con la dosis de  $\alpha$ -amilasa seleccionada (0,079 mg/g harina), el material se autoclavó y tras homogeneizar las muestras, se incubaron con los distintos tratamientos

enzimáticos seleccionados para la etapa de Licuefacción, 2 h a 80 °C en agitación constante. A continuación se describen los tratamientos:

#### 1.- Adición del cóctel 2 ( $\alpha$ -amilasa)

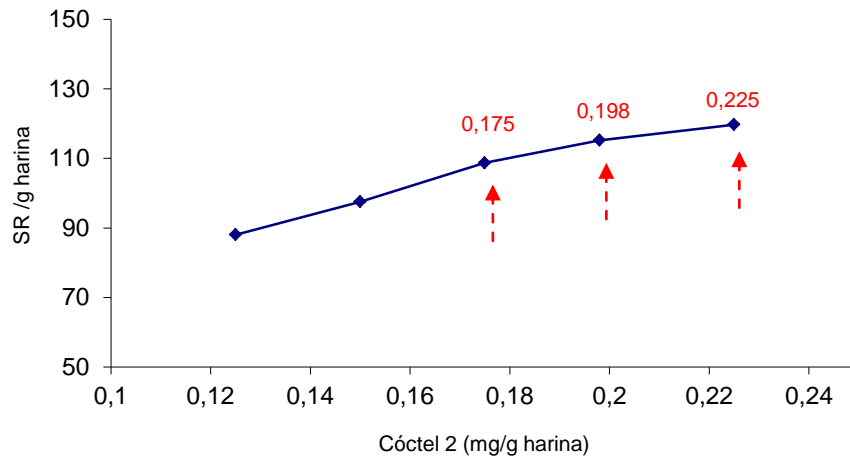
En este ensayo se adicionaron nuevamente distintas dosis del cóctel 2, Liquozyme, con actividad  $\alpha$ -amilasa, usado anteriormente en la etapa de Mezcla. Esta enzima, es también la utilizada en los procesos industriales en esta etapa. La **Tabla 3.9** muestra las diferentes dosis de enzima ensayada.

**Tabla 3.9.** Diferentes dosis del cóctel 2, Liquozyme, con actividad  $\alpha$ -amilasa, utilizado en el proceso de Licuefacción.

Liquozyme	
mg /g harina	U/g harina
0,125	43,0
0,150	51,6
0,175	60,2
0,198	68,1
0,225	77,4

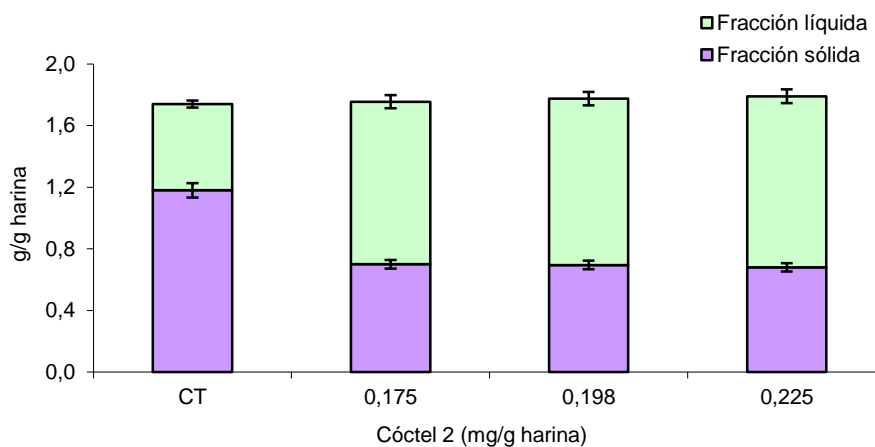
Como en el caso de la etapa de Mezcla, se separaron dos fracciones, líquida y sólida, que se denominaron licuefacción líquida (Lic-LIQ) y sólida (Lic-SOLID). Inicialmente se analizaron también en la fracción líquida los azúcares liberados, mediante un análisis de sustancias reductoras mediante el método de Somogyi y Nelson (**Fig. 3.51**). Los resultados indicaron que las dosis mayores de enzima liberan mayor cantidad de sustancias reductoras.

## Resultados



**Fig. 3.51.** Sustancias reductoras liberadas de la harina de trigo tras el tratamiento de Licuefacción utilizando en esta etapa diferentes dosis de  $\alpha$ -amilasa.

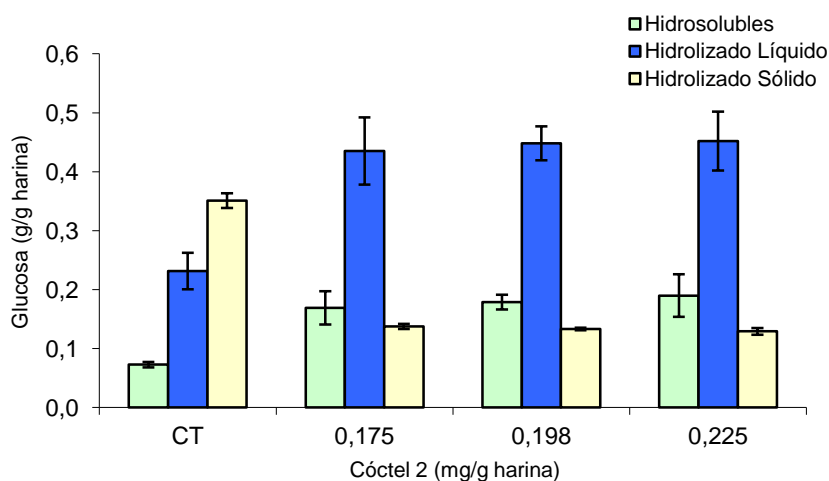
Se repitió el ensayo con las tres dosis que liberaron mayor cantidad de sustancias reductoras, y se completó el estudio de estos tratamientos. La determinación de los pesos secos de las fracciones Lic-LIQ y Lic-SOLID (**Fig. 3.52**), puso de manifiesto una mayor cantidad de azúcares liberados en la fase líquida tras esta etapa, respecto al control. Este resultado era de esperar al estar el material más desestructurado una vez finalizada la etapa de Mezcla y el proceso de autoclavado realizado antes de añadir la  $\alpha$ -amilasa en la etapa de Licuefacción (apartado 2.6). Sin embargo, como en la etapa de Mezcla, no se encontraron diferencias significativas con las tres dosis de enzimas seleccionadas.



**Fig. 3.52.** Pesos obtenidos en la fracción líquida y sólida de la harina de trigo tratada tras la etapa de Licuefacción con diferentes dosis de  $\alpha$ -amilasa.



Con la intención de obtener más información de los azúcares liberados, las fracciones Lic-LIQ y Lic-SOLID se hidrolizaron y su composición monosacarídica se analizó por GC. Los monosacáridos solubles en la fase líquida también se cuantificaron por GC (fracción líquida en la etapa de Licuefacción no hidrolizada, Lic-LIQ-NH). La **Figura 3.53** muestra los valores obtenidos de glucosa (g/g harina) en todos los casos. Al comparar con la etapa de Mezcla (**Fig. 3.50**), se observa cómo han aumentado tanto los valores de glucosa en los hidrosolubles como en hidrolizados líquidos y por tanto la glucosa de la fracción sólida disminuye. Tampoco en este punto se encontraron diferencias significativas con las tres dosis de enzimas ensayadas.



**Fig. 3.53.** Contenido de glucosa de las fracciones Lic-LIQ-NH (hidrosolubles), Lic-LIQ (hidrolizado líquido) y Lic-SOLID (hidrolizado sólido), obtenidas tras el proceso de Licuefacción de la harina de trigo, utilizando diferentes dosis de  $\alpha$ -amilasa.

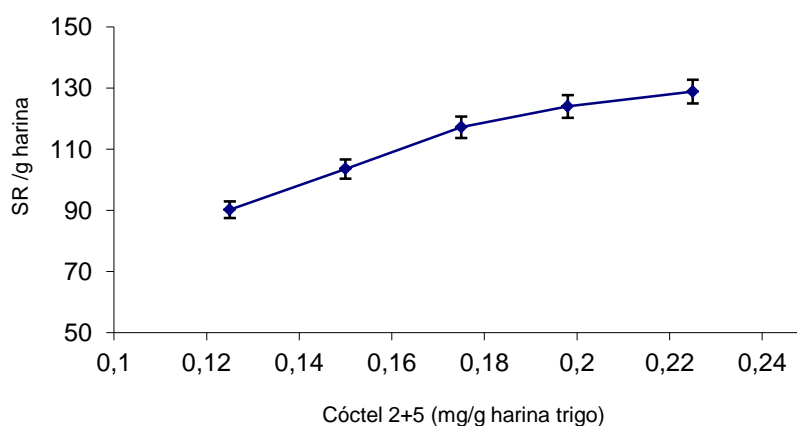
## 2.- Adición simultánea de cóctel 2, $\alpha$ -amilasa, y cóctel 5 ,endoglucanasa/xilanasa

La adición simultánea de dos cócteles es una práctica común en la producción de bioetanol a nivel industrial. En este experimento se emplearon diferentes dosis del cóctel 2, Liquozyme, con actividad  $\alpha$ -amilasa, y la misma dosis del cóctel 5, Viscozyme Wheat, con actividad endoglucanasa/xilanasa (**Tabla 3.10**). Las condiciones del proceso y tiempos de incubación fueron las mismas que en el ensayo anterior.

**Tabla 3.10.** Diferentes dosis del cóctel 2, con actividad  $\alpha$ -amilasa, suplementadas con una única dosis del cóctel 5, con actividad endoglucanasa/xilanasa, para completar la etapa de Licuefacción.

Cóctel 2		Cóctel 5	
mg /g harina	U/g harina	mg /g harina	U /g harina
0,125	43,0	<b>0,149</b>	<b>2,5</b>
0,150	51,6		
0,175	60,2		
0,198	68,1		
0,225	77,4		

Como en casos anteriores, se separaron dos fracciones: líquida (Lic-LIQ-2+5) y sólida (Lic-SOLID-2+5). En la **Figura 3.54** se muestran los azúcares liberados en la fracción líquida, en equivalentes de sustancias reductoras. Se observa un ligero incremento de los azúcares liberados utilizando las dos enzimas, respecto al ensayo en el que solo se utilizó  $\alpha$ -amilasa. Se constató también, como en casos anteriores, un aumento progresivo de azúcares liberados cuando se aumenta la dosis de enzima, obteniéndose valores semejantes con las dosis de enzima más altas.

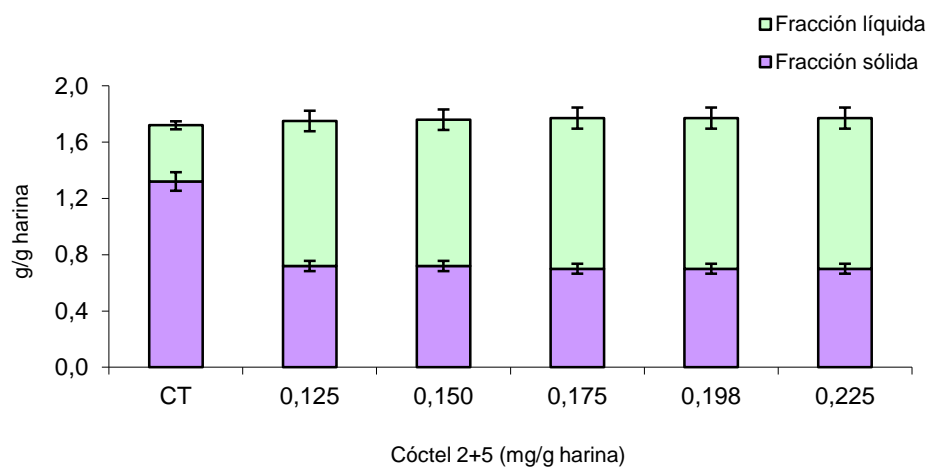


**Fig. 3.54.** Sustancias reductoras liberadas de la harina de trigo tras el tratamiento de Licuefacción con diferentes dosis de  $\alpha$ -amilasa, y una dosis única del cóctel 5 (0,149 mg/g harina), con actividad endoglucanasa/xilanasa.

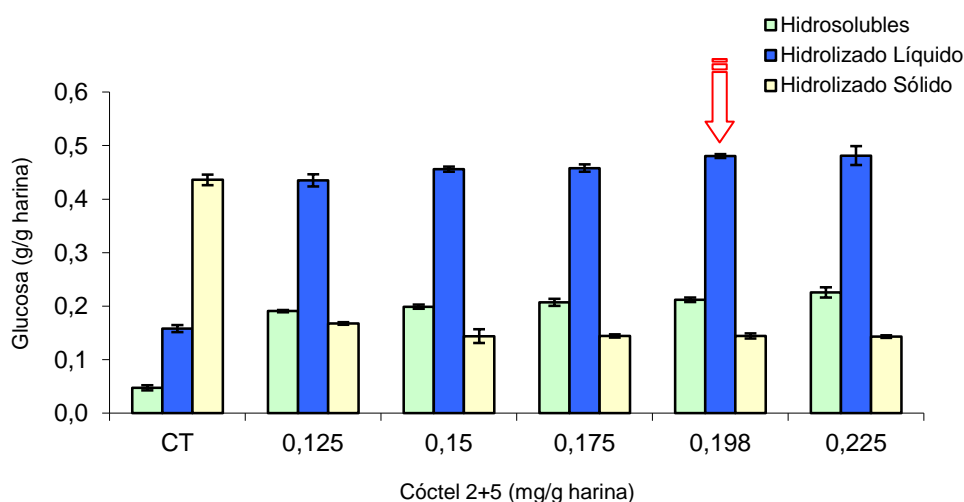
A continuación se determinó el peso seco, tras liofilización, de las fracciones líquidas y sólidas de todas las dosis ensayadas (**Fig. 3.55**). También en este caso, se encontró que el peso de la fracción sólida era menor respecto a la etapa de Licuefacción sólo con  $\alpha$ -amilasa, aumentando a expensas de esta el peso de la fracción líquida. Como en

casos anteriores no se apreciaron diferencias significativas en el peso de las fracciones con las diferentes dosis de enzimas ensayadas.

El análisis de los azúcares presentes en las fracciones, Lic-LIQ-2+5-NH, Lic-LIQ-2+5 y Lic-SOLID-2+5, se muestra en la **Figura 3.56**. Los resultados obtenidos indican que tampoco en este caso existen diferencias significativas con las diferentes dosis de enzimas, aunque es a las dosis más altas el contenido en glucosa fue ligeramente mayor. Por esta razón se escogió la dosis 0,198 mg de  $\alpha$ -amilasa por g de harina para continuar los experimentos.



**Fig. 3.55.** Pesos obtenidos de las fracciones líquida y sólida de la harina de trigo, tratada en este ensayo de Licuefacción con diferentes dosis de  $\alpha$ -amilasa, y una dosis única del cóctel 5, con actividad endoglucanasa/xilanasas.



**Fig. 3.56.** Contenido de glucosa en las fracciones Lic-LIQ-2+5-NH (hidrosolubles), Lic-2+5-LIQ (hidrolizado líquido) y Lic-2+5-SOLID (hidrolizado sólido), obtenidas tras el proceso de Licuefacción de la harina de trigo. Se utilizaron diferentes dosis de  $\alpha$ -amilasa y una dosis única del cóctel 5, con actividad endoglucanasa/xilanasas. La flecha indica la dosis seleccionada para estudios posteriores.

### 3.- Cóctel 2, $\alpha$ -amilasa, más nuevos cócteles con actividades endoglucanasa y/o xilanasa

Tras la caracterización de los diferentes cócteles enzimáticos estudiados en el primer apartado de este trabajo, se decidió probar los cócteles 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye, en el proceso de Licuefacción. El objetivo era la búsqueda de complejos enzimáticos alternativos, con mayor actividad endoglucanasa que la del cóctel 5, Viscozyme Wheat (**Tabla 3.11**).

**Tabla 3.11.** Actividad endoglucanasa en los cócteles comerciales utilizados en este ensayo (viene de la Tabla 3.1).

Complejos comerciales		Actividad Endoglucanasa U/mg proteína
5	Viscozyme Wheat	17
6	Ultraflo	23
7	Viscozyme Rye	35

Tal como se indica en el apartado 2.6.2 de Materiales y Métodos, los experimentos se realizaron suplementando el cóctel 2 con el cóctel 5 (igual que en el apartado anterior) o los nuevos cócteles 6 y 7 teniendo en cuenta en este caso dos posibles opciones: i) manteniendo la misma cantidad de proteína para los complejos con mayor actividad endoglucanasa y ii) manteniendo la misma actividad, es decir menor cantidad de proteína para estos cócteles (**Tabla 3.12**).

**Tabla 3.12.** Dosificación de los complejos enzimáticos en este ensayo de Licuefacción. En la Tabla **A** se resume la dosis de los complejos utilizados con la misma cantidad de proteína. La Tabla **B** refleja la dosificación en base a la misma actividad endoglucanasa.

<b>A</b>		
Dosificación en función de la proteína		
Cócteles enzimáticos	Proteína (mg/g harina)	Actividad Endoglucanasa (U/g harina)
5	<b>0,149</b>	2,5
6	<b>0,149</b>	3,4
7	<b>0,149</b>	5,2

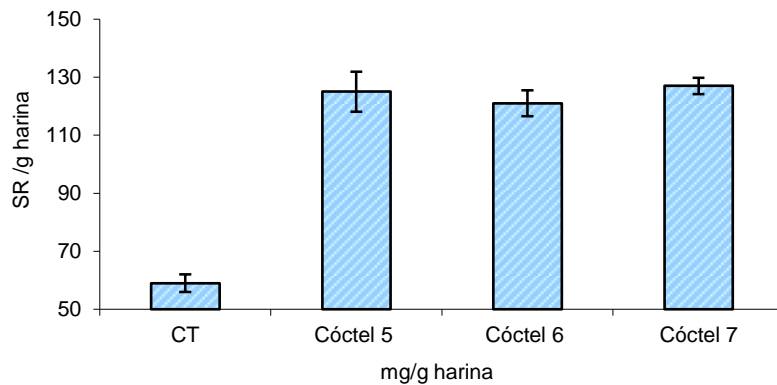
  

<b>B</b>		
Dosificación en función de la actividad endoglucanasa		
Cócteles enzimáticos	Proteína (mg/g harina)	Actividad Endoglucanasa (U/g harina)
5	0,149	<b>2,5</b>
6	0,108	<b>2,5</b>
7	0,071	<b>2,5</b>

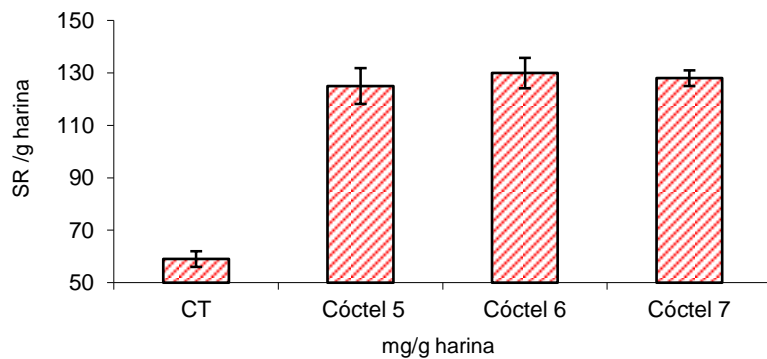
Tras los tratamientos enzimáticos con las diferentes dosis de enzimas se recogieron las fracciones líquida y sólida de cada uno de los tratamientos y se analizaron las sustancias reductoras en la fase líquida, el peso de las diferentes fracciones y el contenido en azúcares de estas por GC.

Los resultados de la valoración de sustancias reductoras en la fase líquida, tanto con la misma dosificación proteica como en función de su actividad endoglucanasa, se muestran en las **Figuras 3.57 y 3.58**. Al comparar los gráficos, se observa cómo en ambos casos los cócteles 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye, liberaron niveles similares de sustancias reductoras que el cóctel 5, Viscozyme Wheat. Esto sugiere que se ha alcanzado un máximo de liberación de estas con todas las dosis utilizadas, indicando que se podría reducir la dosis de estas enzimas.

El análisis de los tratamientos continuó con las determinaciones de peso seco de las fracciones líquidas y sólidas de todas las dosis ensayadas (**Fig. 3.59 y 3.60**). Los pesos obtenidos en los distintos tratamientos, como se ha señalado en ensayos anteriores, no mostraron diferencias. Sin embargo, al comparar los tratamientos con el control, se hace evidente la acción de las enzimas y la transformación de los azúcares de la harina de almidón (fracción sólida) en azúcares solubles, lo que se traduce en un aumento del peso de la fracción líquida.

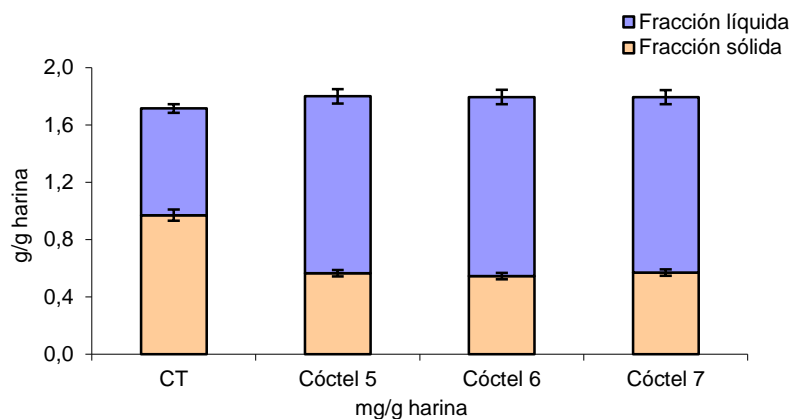


**Fig. 3.57.** Sustancias reductoras liberadas con las diferentes dosis de enzimas, utilizando la misma cantidad de proteína para los distintos cócteles.

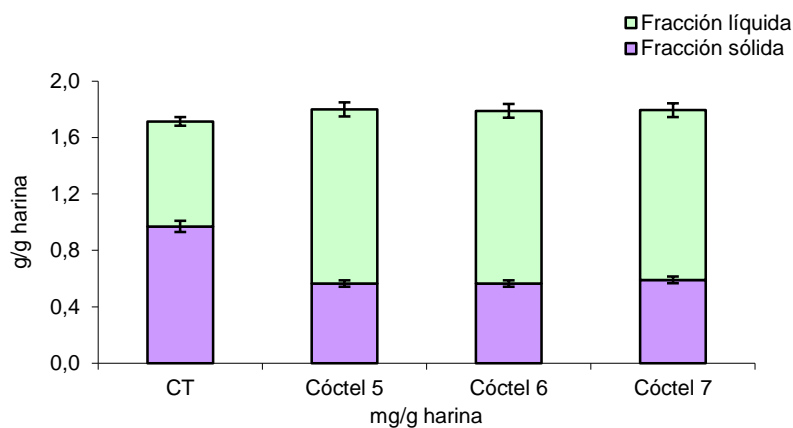


**Fig. 3.58.** Sustancias reductoras liberadas con las diferentes dosis de enzimas, utilizando la misma actividad endoglucanasa para los distintos cócteles.

## Resultados



**Fig. 3.59.** Pesos obtenidos de las fracciones líquida y sólida de la harina de trigo, tratada en este ensayo de Licuefacción con una dosis determinada de  $\alpha$ -amilasa, y utilizando la misma la cantidad de proteína en los complejos 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye.

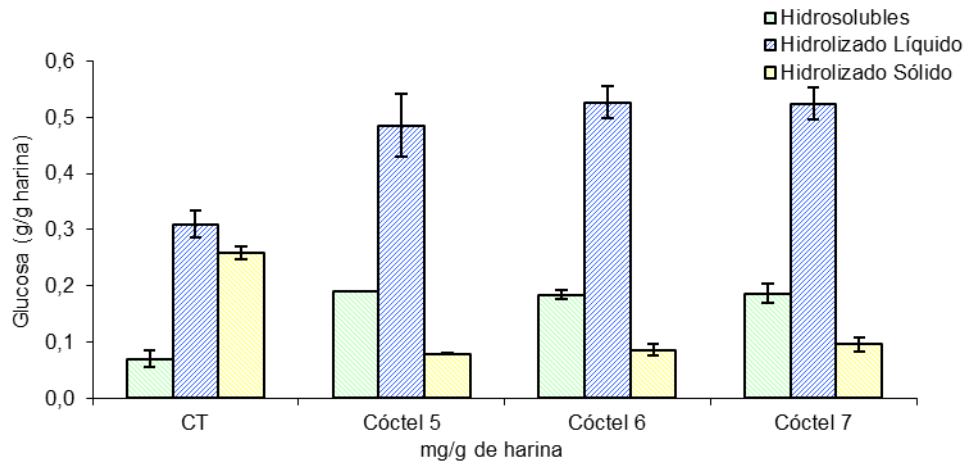


**Fig. 3.60.** Pesos obtenidos de las fracciones líquida y sólida de la harina de trigo, tratada en este ensayo de Licuefacción con una dosis determinada de  $\alpha$ -amilasa, y utilizando la misma actividad endoglucanasa en los complejos 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye.

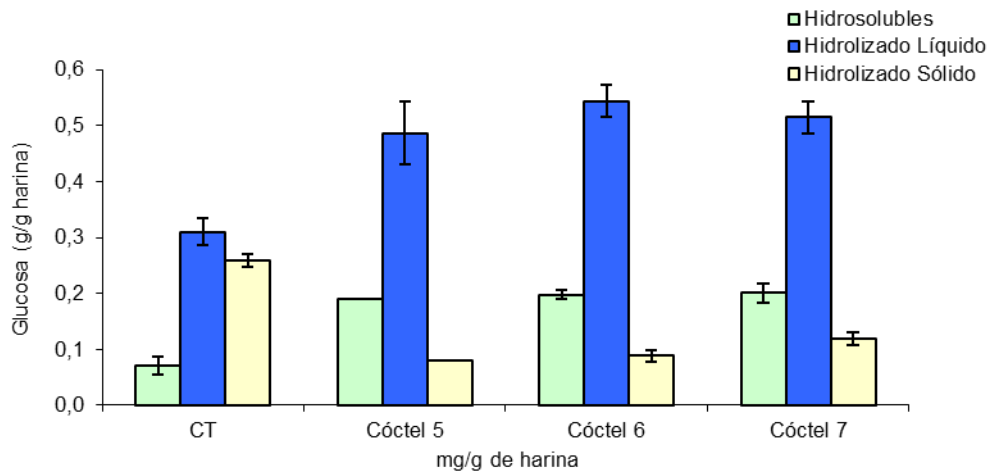
Finalmente, el resultado de la composición monosacáridica de las diferentes fracciones analizadas se muestra en las **Figuras 3.61 y 3.62**.

Estos resultados muestran que no existen diferencias significativas utilizando las mismas unidades de actividad endoglucanasa con los distintos complejos. Destacar que tanto con el cóctel 6, Ultraflo, como con el 7, Viscozyme Rye, se utilizó menos cantidad de proteína por g de harina que con el cóctel 5, Viscozyme Wheat, aunque se mantuvieron las mismas U/g de harina.

## Resultados



**Fig. 3.61.** Contenido de glucosa en las distintas fracciones: hidrosoluble, hidrolizado líquido e hidrolizado sólido, obtenidas tras el proceso de Licuefacción de la harina de trigo, utilizando diferentes cócteles comerciales dosificados con la misma cantidad de proteína.



**Fig. 3.62.** Contenido de glucosa en las distintas fracciones: hidrosoluble, hidrolizado líquido e hidrolizado sólido, obtenidas tras el proceso de Licuefacción de la harina de trigo, utilizando diferentes cócteles comerciales dosificados con la misma actividad endoglucanasa.

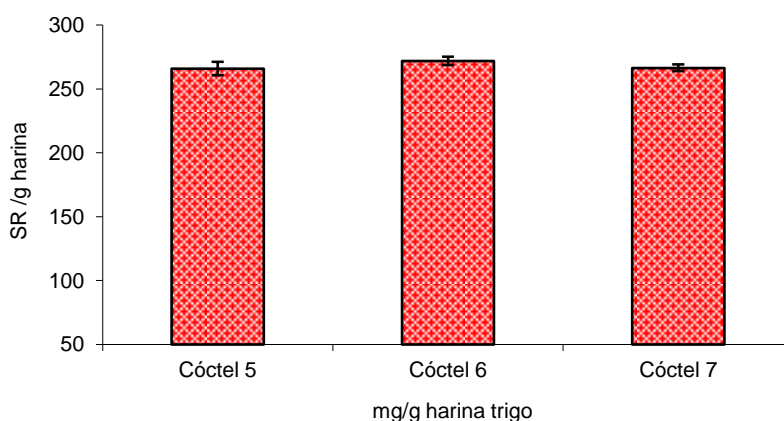
### 3.3.3 ETAPA DE SACARIFICACIÓN

Esta etapa se llevó a cabo tras la etapa de Licuefacción realizada con las mezclas de los tres cócteles utilizados en el apartado anterior: i) cóctel 2+5; ii) 2+6 y iii) 2+7. En todos los casos se utilizaron 0,198 mg de  $\alpha$ -amilasa (cóctel 2) y 2,5 U de actividad endoglucanasa por g de harina (que se corresponde con 0,149, 0,108 y 0,071 mg de proteína por gramo de harina, respectivamente).



Terminada la fase de Licuefacción, se añadió a todos los tratamientos la misma dosis del cóctel 3, Spirizyme Fuel, con actividad glucoamilasa (0,409 mg de proteína/g de harina). Tras 60 h de incubación (apartado 2.6.3.1), se separaron dos fracciones, sacarificación líquida (Sac-LIQ) y sólida (Sac-SOLID) y se analizaron, como en los apartados anteriores las sustancias reductoras de la fase líquida, los pesos de las fracciones líquida y sólida y los azúcares presentes en estas por GC.

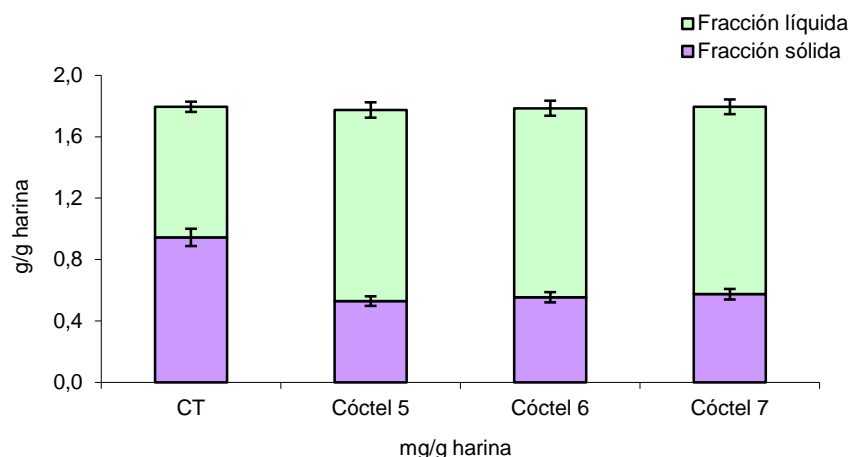
La **Figura 3.63** pone de manifiesto que las sustancias reductoras liberadas a la fase líquida se incrementan significativamente tras esta etapa ( $\approx$  un 50% respecto a la etapa de Licuefacción), ya que la enzima está liberando glucosa de los oligosacáridos presentes en la mezcla. Tal como se esperaba, no se observan diferencias significativas con los diferentes cócteles utilizados en la etapa de Licuefacción.



**Fig. 3.63.** Sustancias reductoras liberadas de la harina de trigo tras el tratamiento de Sacarificación.

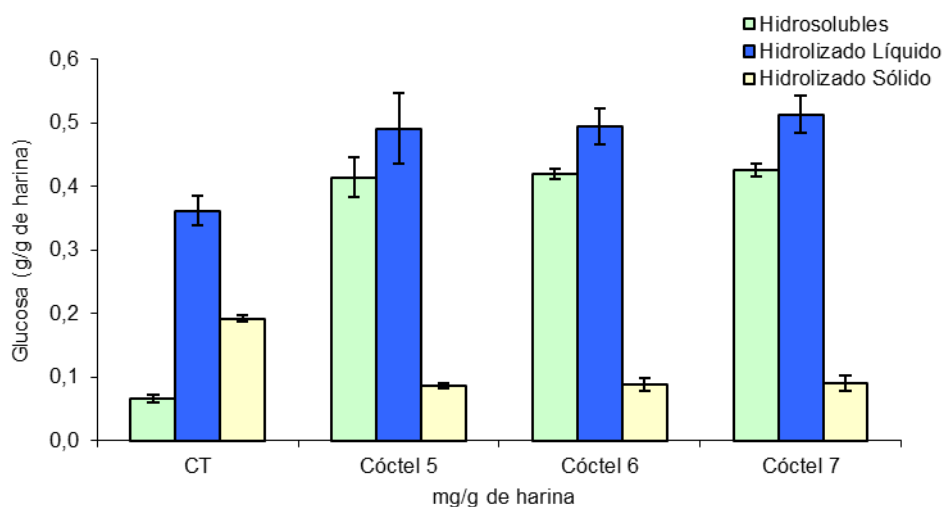
La **Figura 3.64** muestra los pesos obtenidos de las diferentes fracciones con los distintos tratamientos. En este caso se observa un ligero aumento de los pesos de las fracciones líquidas, respecto a los obtenidos en licuefacción. No hay aumento de peso en esta etapa ya que en la licuefacción ya se habían solubilizado todos los azúcares y en esta solo se terminan de hidrolizar los oligosacáridos hasta glucosa.

## Resultados



**Fig. 3.64.** Pesos obtenidos en la fracción líquida y sólida de la harina de trigo tratada en la etapa de Sacarificación con glucoamilasa.

El análisis de monosacáridos (**Fig. 3.65**), corrobora los resultados obtenidos para las sustancias reductoras ya que tras esta etapa aumenta de manera muy significativa la glucosa presente en la fracción soluble ( $\approx$  50% respecto a la etapa de Licuefacción).



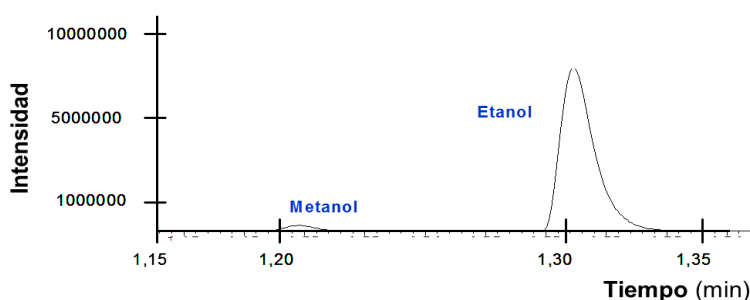
**Fig. 3.65.** Contenido de glucosa en las fracciones: Sac-LIQ-NH (hidrosolubles), Sac-LIQ (hidrolizado líquido) y Sac-SOLID (hidrolizado sólido), obtenidas tras el proceso de Sacarificación de la harina de trigo. La sacarificación se realiza con glucoamilasa, tras la etapa de Licuefacción con  $\alpha$ -amilasa, y diferentes cócteles comerciales (5 o 6 o 7) con la misma actividad endoglucanasa.

### 3.3.4 ETAPA DE FERMENTACIÓN

Esta última etapa se realizó añadiendo la levadura *S. cerevisiae* (apartado 2.6.3.2) al mosto fermentable, resultado del proceso de Sacarificación realizado con los diferentes cócteles. Tras 40 horas de

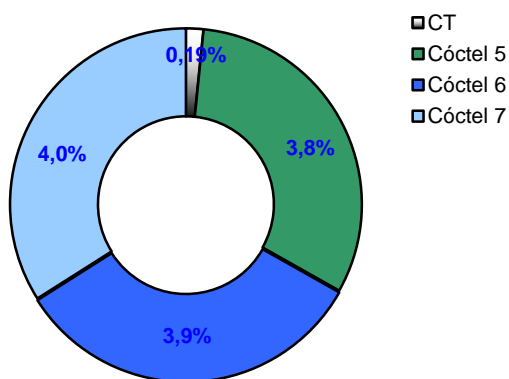
fermentación con la levadura, se extrajo el etanol presente en los cultivos y se cuantificó por cromatografía de gases (apartado 2.7.5).

La **Figura 3.66** muestra un cromatograma típico de una muestra fermentada y extraída, en la que se observa el metanol, añadido como patrón interno, y el etanol producido por la levadura. En todos los casos se observa un notable incremento en la producción de etanol, respecto a la muestra control ( $p \leq 0,5$ ).



**Fig. 3.66.** Perfil cromatográfico en el que se cuantifica el etanol producido por la levadura, en una de las muestras analizadas tras el proceso de Fermentación.

La producción de etanol tras la etapa de Licuefacción y Sacarificación, utilizando en esta una mezcla de  $\alpha$ -amilasa y tres cócteles distintos con actividad endoglucanasa, se muestra en la **Figura 3.67**.



**Fig. 3.67.** Etanol producido (%) una vez realizada la fermentación con *S. cerevisiae* de la paja de trigo, tras la etapa de Licuefacción y Sacarificación utilizando un cóctel con actividad  $\alpha$ -amilasa, y diferentes complejos enzimáticos con actividad endoglucanasa.

## *Resultados*

Una vez finalizado el proceso de producción de bioetanol, realizado en el laboratorio, los resultados indican que no existen diferencias significativas en la concentración de etanol producido con las diferentes mezclas en la etapa de Licuefacción, de acuerdo con los valores de glucosa obtenidos tras la etapa de Sacarificación.



### **3.4 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE PAJA DE TRIGO: APLICACIÓN DE LACASAS FÚNGICAS EN EL PROCESO**



El objetivo de este apartado fue examinar los efectos del tratamiento con lacasas fúngicas sobre el *slurry* de paja de trigo, material que se obtiene tras un tratamiento con *steam explosion* (apartado 2.1.2). Para ello analizamos la evolución del contenido en fenoles durante el proceso, el contenido en azúcares de la materia tratada, el crecimiento de la levadura y, finalmente, la producción de bioetanol.

Tal como se indica en Materiales y Métodos (apartado 2.3.2) se utilizaron para este trabajo dos lacasas fúngicas de diferentes, basidiomicetos: i) la de *C. rigida*, obtenida en el laboratorio y ii) la de *T. villosa*, cedida por Novozymes®.

También se utilizaron dos tipos de *slurries* obtenidos mediante *steam explosion* en condiciones diferentes: i) en presencia de vapor de agua (***slurry* agua**) y ii) en presencia de ácido diluido (***slurry* ácido**). La diferencia fundamental entre los dos tratamientos de *steam explosion* es que el pH ácido facilita la solubilización de las hemicelulosas, pudiendo recuperarse mayor contenido de azúcares en estas condiciones (hexosas + pentosas). Aunque de momento no es posible fermentar las pentosas a nivel industrial, en caso de que estas pudieran llegar a fermentarse se aumentaría significativamente el rendimiento en la producción final de etanol lignocelulósico.

El pH y peso seco de los *slurries* utilizados en este apartado se muestra en la **Tabla 3.13**.

**Tabla 3.13.** Características de los *slurries* obtenidos.

<i>Slurries</i> utilizados	Peso seco (%)	pH
<b>AGUA</b>	16,6	3,8
<b>ÁCIDO</b>	33,3	1,5



### 3.4.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES PARA EL TRATAMIENTO DEL SLURRY CON LACASAS

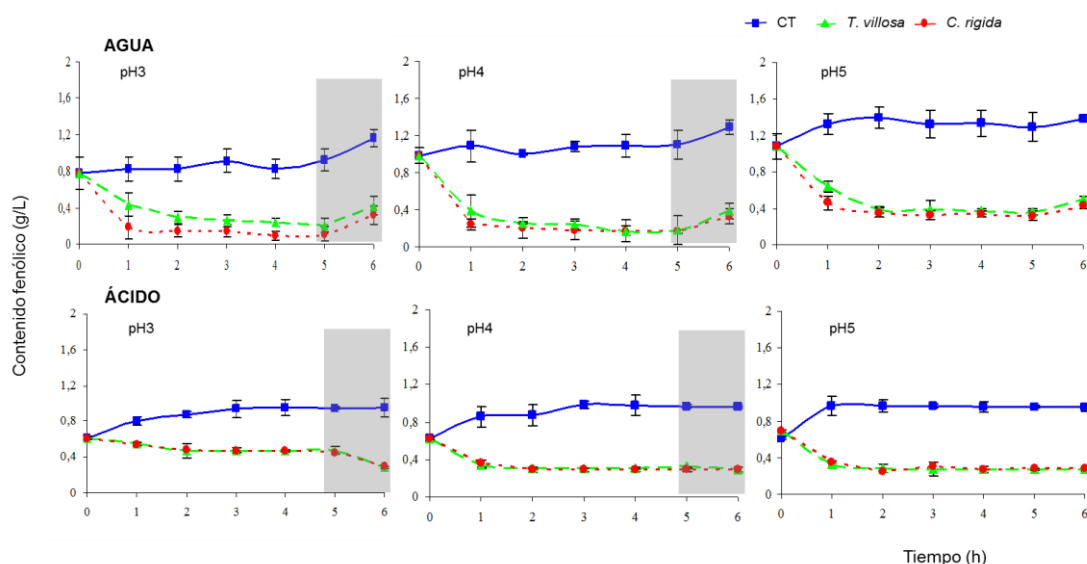
Todos los experimentos se realizaron utilizando una concentración de un 5% de sólidos, con el fin de asegurar que la enzima pudiera tener acceso a todo el material y analizar el efecto de los tratamientos tanto en la fase líquida como en la sólida (apartado 2.7). En la fase líquida, que denominamos prehidrolizado por ser la etapa de tratamiento anterior a la hidrólisis del material con celulasas comerciales, estarían la mayoría de los compuestos fenólicos liberados en el proceso. Dado que las lacasas oxidarían los fenoles libres presentes en este prehidrolizado, para optimizar los tratamientos con esta enzima se utilizó la fase líquida.

#### Efecto del pH en los tratamientos de *slurry* con lacasas

Inicialmente se analizó el efecto del pH en el tratamiento de los *slurries* obtenidos con vapor de agua o con ácido diluido, utilizando 1 U/mL de las lacasas de *C. rigida* y *T. villosa* (**Fig. 3.68**). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los tratamientos realizados con las dos lacasas utilizadas. Existen algunas diferencias en el contenido en fenoles libres de los *slurries* a los distintos pH, encontrando mayor cantidad de estos a pH 5 pero, en todos los casos, el tratamiento con las lacasas disminuyó los fenoles libres de las muestras ( $p \leq 0,5$ ).

Con la intención de ver si el pH ejercía un efecto significativo en la concentración de fenoles, tras el tratamiento a distintos pH se ajustó, en todos ellos, el pH a 5 y se mantuvo el tratamiento 1 hora más a este pH. La reducción de fenoles, respecto a su control, fue 36% a pH 3, 25% a pH 4 y 30% a pH 5 en las muestras de *slurry* agua y 30% en las muestras de *slurry* ácido a todos los pH estudiados. La menor concentración de fenoles libres a pH ácidos podría deberse a una precipitación parcial o polimerización de estos, pero en todos los tratamientos se comprobó la eficacia de las lacasas para reducir el contenido en fenoles libres de ambos *slurries*.

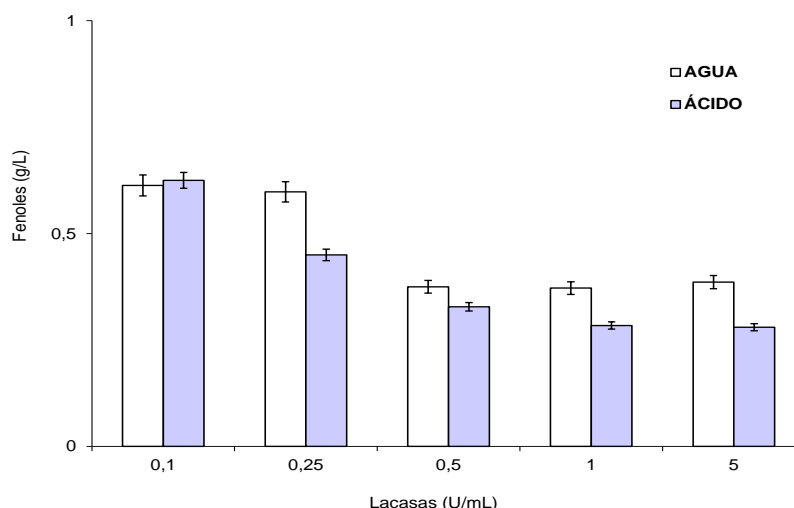
## Resultados



**Fig. 3.68.** Variación del contenido fenólico en el prehidrolizado de los *slurries*, obtenidos con vapor de agua (agua) y en presencia de ácido diluido (ácido), antes y después de tratar con lacasas de *C. rigida* y *T. villosa*. El ensayo se realizó a distintos pH y el área sombreada indica la zona de ajuste a pH 5.

### Efecto de la dosis de enzima y el tiempo de incubación en la precipitación de fenoles en los *slurries*

A continuación se optimizó la dosis de enzima utilizando la lacasa de *C. rigida* y los dos tipos de *slurries*. El experimento se realizó a pH 5, basándonos en los resultados anteriores y pensando en la etapa posterior de hidrólisis enzimática, en el que se utilizarán celulasas que tienen mayor actividad a este pH. También se redujo en este experimento el tiempo de incubación a 2 h ya que se había comprobado (**Fig 3.68**) que la mayor reducción de fenoles ocurría durante las 2 primeras horas de tratamiento. Los resultados en los ensayos realizados utilizando de 0,1 a 5 U/mL de lacasa (**Fig. 3.69**) muestran que utilizando 0,5 U/mL de enzima se consiguió la máxima reducción de fenoles tanto en *slurry* obtenido con vapor de agua como en el ácido. Mayor dosis de enzima no produjo efectos significativos.



**Fig. 3.69.** Reducción de fenoles en los *slurries* obtenidos con vapor de agua o ácido, tras el tratamiento con diferentes dosis de lacasa.

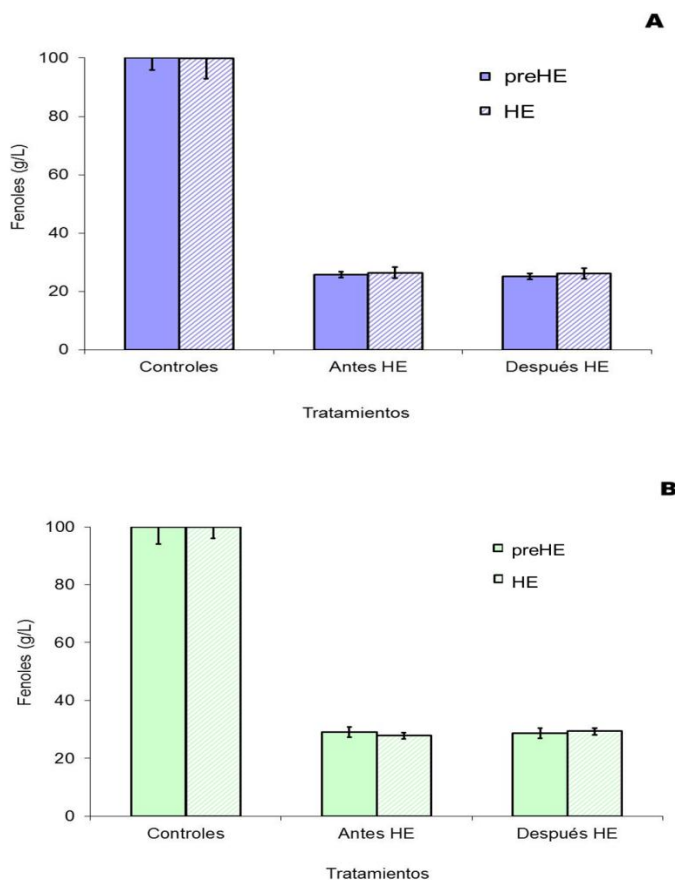
### 3.4.2. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE *SLURRY* DE PAJA DE TRIGO

Una vez finalizados los ensayos preliminares se fijaron las condiciones para el tratamiento con lacasas de los *slurries*, con el fin de completar el proceso de esta paja pretratada hasta obtener bioetanol. Las muestras de *slurry* obtenido con vapor de agua o ácido, fueron tratadas con 0,5 U/mL de lacasa de *C. rigida*, pH 5 durante 2 h. Los tratamientos con lacasa del *slurry* se realizaron antes y después de la hidrólisis enzimática (HE) con celulasas comerciales (endo y exo celulasas y  $\beta$ -glucosidasas). El experimento se diseñó así (apartado 2.7.2) con el fin de estudiar si las lacasas producían algún efecto sobre el proceso de hidrólisis, ya que este paso es imprescindible para que se produzca glucosa a partir de la celulosa que queda accesible en la paja tras el tratamiento con *steam explosión*.

#### Análisis de fenoles

La **Figura 3.70** muestra cómo el contenido en fenoles libres de las muestras tratadas con lacasa, antes y después del tratamiento con las celulasas, es semejante. En el caso del *slurry* obtenido con vapor de agua, la reducción de fenoles fue alrededor del 75%. En el caso del

*slurry* ácido, la reducción de fenoles fue ligeramente menor, alrededor del 70%, antes y después de la etapa de hidrólisis con celulasas.

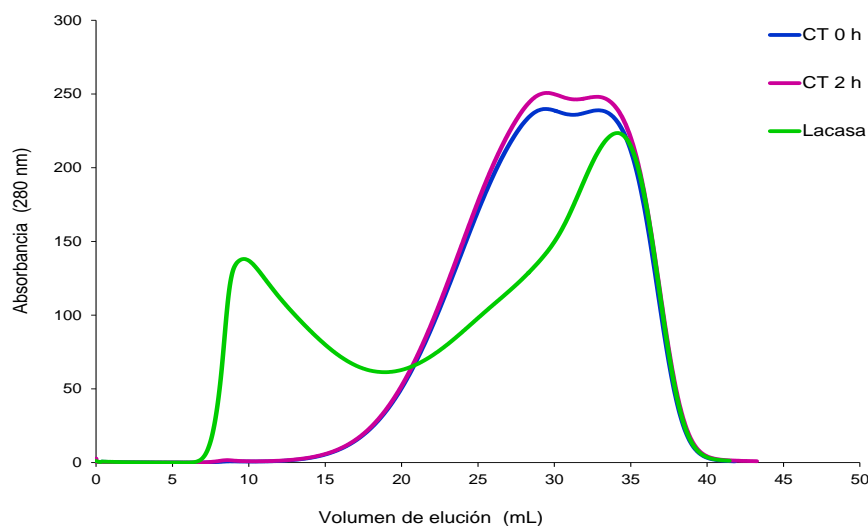


**Fig. 3.70.** Contenido fenólico (g/L) de las muestras de *slurry* obtenido con vapor de agua (gráfico **A**) y *slurry* ácido (gráfico **B**) tratadas con lacasas, antes (preHE) y después de la hidrólisis enzimática (HE) con celulasas. Los controles no se trataron con la enzima.

### Análisis de masas moleculares de los compuestos presentes en el prehidrolizado

El análisis de la distribución de masas moleculares de los compuestos presentes en la fase líquida del prehidrolizado del *slurry*, antes y después del tratamiento con la lacasa, se realizó con muestras de *slurry* obtenido con vapor de agua, mediante cromatografía exclusión molecular (apartado 2.7.4). Los resultados (**Fig. 3.71**), tras 2 h de incubación, indican que la distribución de masas moleculares no varía en los controles sin enzima (realizados a tiempo cero y tras las 2 h de tratamiento). Sin embargo, en la muestra de *slurry* tratado con lacasa se observa cómo la fracción con los compuestos de menor masa molecular

disminuye, apareciendo una nueva fracción de mayor masa molecular, como consecuencia de la polimerización de los fenoles libres por la acción de la lacasa.

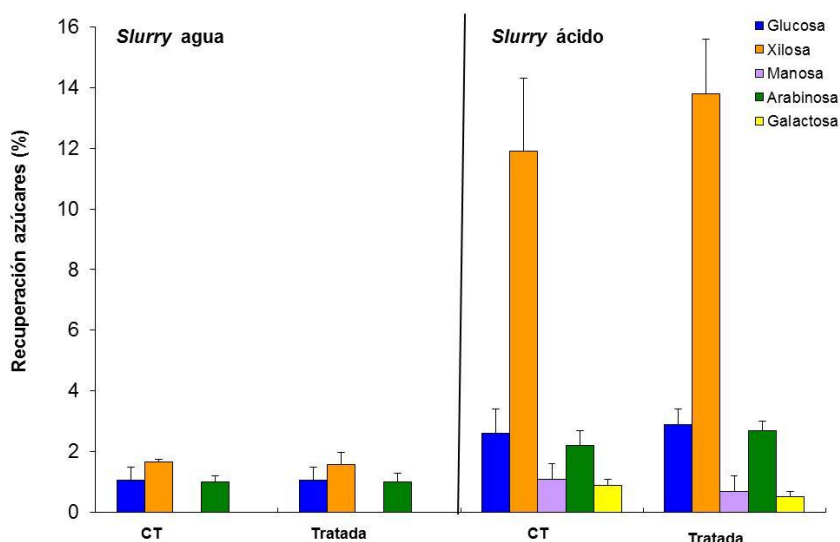


**Fig. 3.71.** Perfil de exclusión molecular de la muestra de prehidrolizado de *slurry* obtenido con vapor de agua, en muestras control, sin enzima, y tratadas 2 h con la lacasa de *C. rigida*. Los controles (CT) se incubaron en las mismas condiciones y se analizaron a las 0 y 2 h de tratamiento.

#### Análisis del contenido en azúcares fermentables en las distintas fracciones de la paja tratada con *steam explosion*

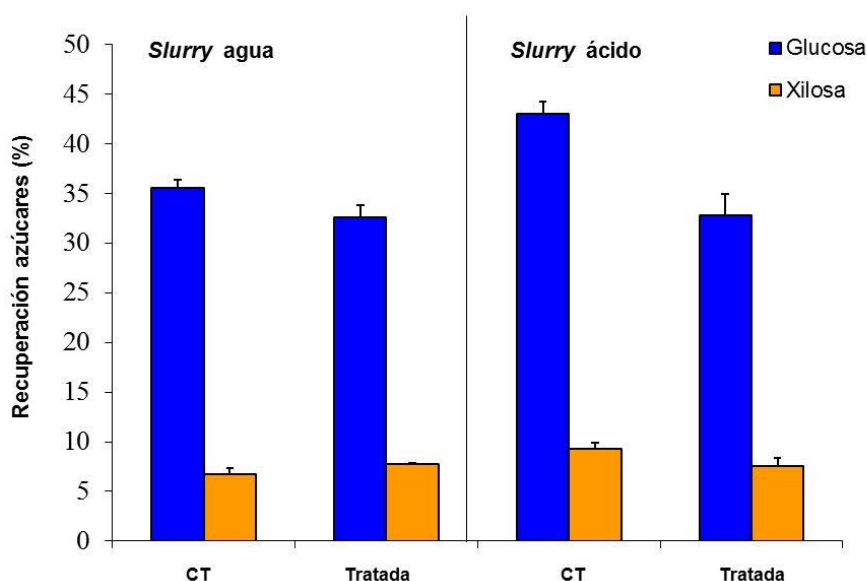
Estos análisis se realizaron tanto en el prehidrolizado (fracción líquida) de la paja tratada con *steam explosion*, como en los *slurries* (fracción sólida) hidrolizados con celulasas (apartado 2.7.2).

El análisis de los azúcares presentes en la fase líquida del prehidrolizado se realizó por GC, utilizando los dos tipos de *slurries* (apartado 2.5.6). En la **Figura 3.72**, se observa el contenido en monosacáridos libres (xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y glucosa) de los dos tipos de *slurries* estudiados. Cabe resaltar que en el *slurry* ácido la concentración de xilosa liberada es mucho mayor, ya que en presencia del ácido durante la *steam explosion* se solubiliza mucho más la hemicelulosa.



**Fig. 3.72.** Monosacáridos presentes en el prehidrolizado de los *slurries* estudiados (agua y ácido), tras el proceso de *steam explosion*. Los controles (CT) se incubaron en las mismas condiciones, sin enzima.

La fracción sólida, una vez separado el prehidrolizado, en la que se encuentra fundamentalmente la celulosa de la paja tras *steam explosion*, se trató durante 72 h con celulasas comerciales (apartado 2.7.2.1). En las muestras obtenidas tras la hidrólisis enzimática, también se analizó su contenido en azúcares libres. Los resultados (**Fig. 3.73**) confirman que el tratamiento con lacasas afectó negativamente el proceso de hidrólisis enzimática en los dos tipos de *slurries*, más en el caso del *slurry* ácido, ya que los azúcares recuperados tras esta etapa fueron menores que sus controles respectivos. En el *slurry* ácido la recuperación de glucosa fue mayor, ya que a pH ácido la desestructuración de la pared celular de la paja de trigo es mayor y en estas condiciones probablemente también favorece la acción de las celulasas. La xilosa libre en esta fase es mucho menor ya que la mayor parte de este azúcar ha quedado en el prehidrolizado.



**Fig. 3.73.** Azúcares liberados en el hidrolizado de los *slurries* (agua y ácido), tras el proceso de *steam explosion* y el tratamiento de hidrólisis con celulasas comerciales. Los controles (CT) se incubaron en las mismas condiciones, sin enzima.

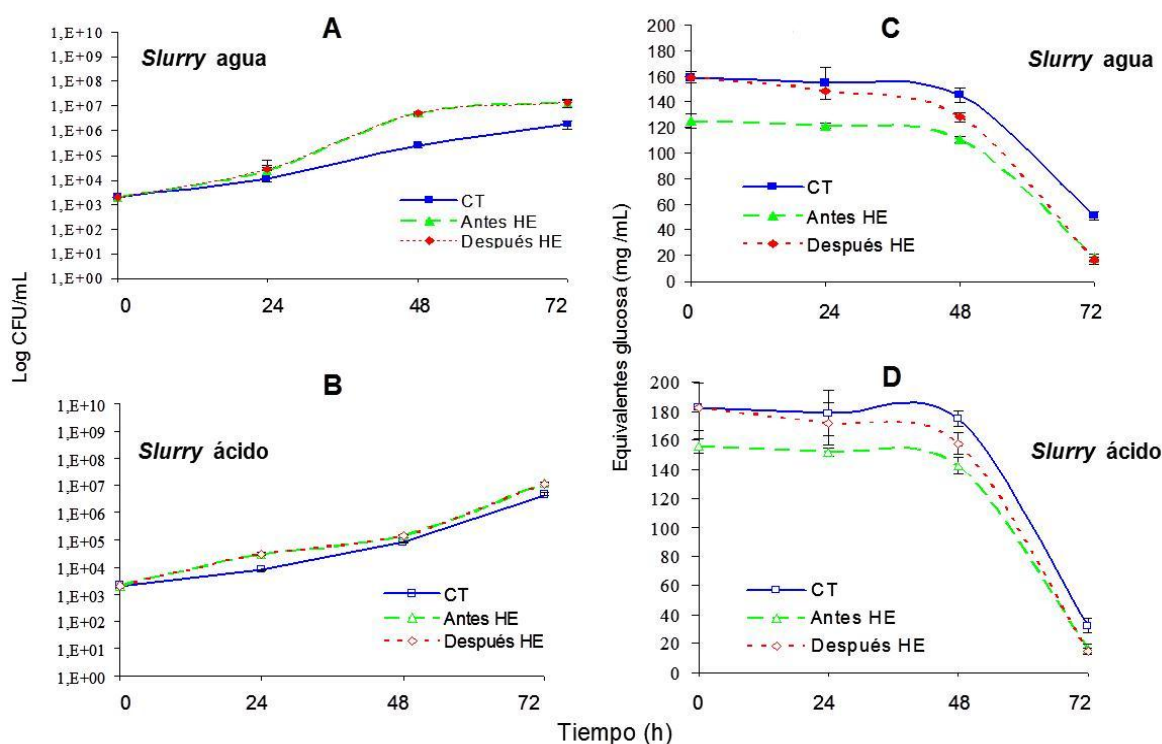
### Crecimiento de las levaduras y producción de etanol

Con la finalidad de completar el efecto de las lacasas en el proceso de la producción de etanol a partir de paja de trigo, se evaluó el efecto del tratamiento enzimático de los *slurries*, obtenidos con vapor de agua o ácido, sobre el crecimiento de las levaduras y la producción final de etanol (apartado 2.7.2.2).

La **Figura 3.74, A y B**, muestra el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae*, cuantificado como unidades formadoras de colonias (UFC), tras incubar esta 3 días con los mostos obtenidos, tras la hidrólisis enzimática con celulasas (apartado 2.7.2.1). Estos mostos se obtuvieron de los *slurries* obtenidos con agua o ácido tratados con lacasas, tanto antes como después de la etapa de hidrólisis con las celulasas comerciales. Los resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con lacasas favorece el crecimiento de las levaduras, tanto en el *slurry* obtenido con vapor agua como en el *slurry* obtenido con ácido. El efecto es mucho más evidente en el *slurry* obtenido con vapor de agua ya que se incrementa mucho más el número de colonias tras 48 h de crecimiento en medio agar-levadura ( $p \leq 0,5$ ). A pesar de haber observado algunas diferencias en los azúcares liberados en el material

hidrolizado, cuando la lacasa se aplicaba antes o después de realizar el tratamiento con celulasas, en el crecimiento de las levaduras no se aprecian diferencias significativas cuando el tratamiento con lacasa se hace antes o después de la etapa de hidrólisis enzimática.

La **Figura 3.74, C y D**, muestra que el consumo de glucosa por las levaduras es mucho más rápido en los dos tipos de *slurries* tras el tratamiento con lacasa.



**Fig. 3.74.** Consumo de azúcares de *S. cerevisiae* al crecer sobre los *slurries*, agua o ácido, tratados con lacasa (antes y después del tratamiento de hidrólisis con celulasas). Los controles (CT) se incubaron en las mismas condiciones, sin lacasa pero realizando la hidrólisis enzimática con celulasas.

Estos resultados ponen de manifiesto el efecto negativo que tienen los fenoles libres presentes en los *slurries* en el crecimiento de las levaduras ya que, al disminuir estos tras el tratamiento con lacasas, la levadura crece más. Este efecto de la lacasa ocurre en los tratamientos realizados antes o después de la hidrólisis con celulasas ( $p \leq 0,5$ ) y confirma el efecto positivo de los tratamientos con lacasa.

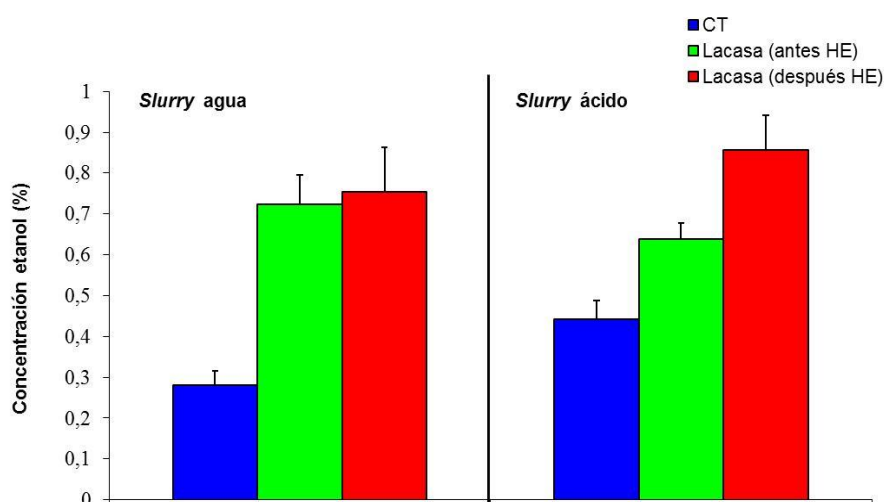
La **Figura 3.75** muestra la producción de bioetanol en los mostos fermentados por las levaduras utilizando los dos *slurries*, tras los tratamientos con lacasa antes y después de la etapa de hidrólisis con



celulasas. Los resultados ponen de manifiesto el efecto favorable del tratamiento con lacasas en la producción de bioetanol en todos los casos.

En el *slurry* obtenido con vapor de agua la concentración de etanol producido tras el tratamiento con lacasa fue más del doble (2,7 veces más) que en los controles sin enzima. No existen diferencias significativas al hacer el tratamiento con lacasas antes o después de la etapa de hidrólisis enzimática con celulasas.

En el *slurry* ácido se produjo casi el doble de etanol en los tratamientos con lacasa aunque, en este caso, sí parece que es mejor aplicar el tratamiento con lacasas tras la etapa de hidrólisis enzimática con celulasas.



**Fig. 3.75.** Etanol producido por *S. cerevisiae* tras la fermentación de los *slurries*, obtenidos con vapor de agua o ácido, tratados con lacasa (antes y después del tratamiento de hidrólisis con celulasas). Los controles (CT) se incubaron en las mismas condiciones, sin lacasa pero realizando la hidrólisis enzimática con celulasas.

Todos estos resultados indican que, tras el tratamiento con la lacasa, los fenoles libres disminuyen y esto contribuye a detoxificar el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento de las levaduras y la producción final de etanol. El mayor efecto de la lacasa sobre el *slurry* obtenido con vapor de agua puede deberse a que en el caso del *slurry* ácido, al ser las condiciones del tratamiento más drásticas se consigue mayor liberación de xilosa, pero también se generan más inhibidores que afectan negativamente al proceso.

## **4. DISCUSIÓN**



## **4.1 ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES**



Las enzimas empleadas en la industria rara vez son enzimas totalmente purificadas. El uso de cócteles enzimáticos en los que predomina una actividad es, por tanto, una herramienta generalmente utilizada en las industrias y concretamente, tal como se ha podido comprobar por los resultados de este trabajo, también ocurre así en las que producen bioetanol.

El empleo de estos cócteles, especialmente en el sector del etanol, puede resultar ventajoso porque en ellos existe una mezcla de enzimas, con diferentes actividades, que pueden requerirse cuando la materia prima que se utiliza en el proceso no es homogénea.

Es necesario destacar que en el caso de etanol de primera generación, obtenido a partir de grano de cereales (1G), el almidón es el componente mayoritario, siendo por tanto, la  $\alpha$ -amilasa la enzima principal. Aunque existen otros componentes en menor proporción (arabinosilanos, celulosa, gluten, etc.) que pueden requerir la adición de otras enzimas para facilitar la transformación de todo el almidón a glucosa. Sin embargo, esta mezcla de enzimas se hace mucho más necesaria al producir etanol a partir de residuo lignocelulósico (2G), donde para acceder a los azúcares fermentables procedentes de la celulosa y hemicelulosa, es fundamental desestructurar la pared celular vegetal, degradando la lignina para dejar más accesibles los polisacáridos, y que las celulasas y hemicelulasas puedan hidrolizarlos hasta azúcares fermentables.

La optimización de la mezcla de estas enzimas, necesarias para cada una de las etapas del proceso, y conocer su estabilidad tanto frente a pH como a temperatura, puede favorecer el rendimiento y ayudar a minimizar los costes finales. Estos complejos enzimáticos deben cumplir estas condiciones y, además ser baratos, estar disponibles en grandes cantidades y ser seguros en su manipulación, para que el producto final, el etanol, pueda tener un precio competitivo, respecto al combustible que queremos sustituir (la gasolina). Por todos estos motivos, el creciente interés por obtener la mayor información posible acerca de los complejos enzimáticos necesarios para producir bioetanol.

Cabe resaltar que las enzimas que se encuentran en los cócteles comerciales que se utilizan en la producción de etanol suelen emplearse también en otros procesos. Este es el caso de las amilasas, necesarias

para la producción de bioetanol a partir de grano de cereales (Nigam y Singh, 1995; Mojovic et al., 2006), que además se emplean en la elaboración del pan y cerveza (Martínez-Anaya y Jiménez, 2001).

A lo largo de este trabajo se han caracterizado distintos cócteles comerciales estudiando, además de su actividad mayoritaria (descrita por los fabricantes), otras actividades enzimáticas que podrían jugar un papel importante tanto en la producción de bioetanol de primera como de segunda generación.

#### 4.1.1 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ENCONTRADAS EN LOS COMPLEJOS COMERCIALES ESTUDIADOS

En este trabajo se han caracterizado 15 complejos enzimáticos (**Tabla 2.3**), algunos de los cuales ya se usan en la industria de producción de bioetanol en diferentes etapas de este proceso. En este capítulo se dividirá la discusión en dos apartados: i) actividades enzimáticas que actúan principalmente en la producción de etanol a partir de grano de cereal (1G), proteasas y amilasas y ii) enzimas utilizadas para la obtención de etanol a partir de residuo lignocelulósico (2G), xilanasas, celulasas y  $\beta$ -(1,3)-glucanasas.

##### Grano de cereal

Las proteasas son necesarias en el caso de utilizar granos de cereal en los que la presencia de gluten pueda dificultar la degradación del almidón, como es el caso de la cebada. Al añadir esta enzima se consigue un doble efecto, hidrolizar las proteínas y mejorar, en gran medida, la calidad final del DDGS (Sánchez y Cardona, 2008). Entre los cócteles estudiados, la **actividad proteasa** solo se encontró, en niveles significativos, en el cóctel 1, Alcalase, coincidiendo con la actividad descrita.

En cuanto a la **actividad  $\alpha$ -amilasa**, implicada en la degradación del almidón, la actividad específica más alta (U/mg) se encuentra en el cóctel 2, Liquozyme, conocido por esta actividad. Comparando esta actividad con los otros cócteles estudiados, cabe destacar el cóctel 3, Spirizyme Fuel, conocido por su actividad glucoamilasa, donde se encontraron también altos niveles de  $\alpha$ -amilasa (la mitad que en Liquozyme) y el

cóctel 4, Viscozyme Barley, conocido por su actividad amilasa/celulasa, mostró 30 veces menos actividad  $\alpha$ -amilasa que Liquozyme.

El cóctel 15, Accellerase, producido por Genecor<sup>®</sup> para trabajar con biomasa lignocelulósica y conocido por sus actividades  $\beta$ -glucosidasa y endoglucanasa, fue el que presentó mayor **actividad glucoamilasa**. Esta actividad también se encontró en Spirizyme Fuel y aunque fue menor que en Accellerase (8 veces menos) este fue el único cóctel estudiado que mostró niveles significativos tanto de  $\alpha$ -amilasa como de glucoamilasa.

Estos complejos estudiados mostraron además, actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, necesaria para degradar los  $\beta$ -(1,3)-glucanos encontrados en los granos de cereales, fundamentalmente en la cebada (apartado 3.2.7). Aunque estos glucanos son minoritarios y solo se encuentran en las ramificaciones laterales de la cadena principal del almidón, también pueden transformarse por estas enzimas en glucosa.

La actividad  $\alpha$ -amilasa es necesaria en las primeras etapas de producción de etanol a partir de grano de cereal, etapas de Mezcla y Licuefacción, para degradar el almidón a moléculas de menor tamaño que puedan ser transformadas, en la etapa de Sacarificación, a glucosa, por la acción de glucoamilasas. De los resultados de este estudio, para las etapas de Mezcla y Licuefacción, el cóctel 2, Liquozyme de Novozymes<sup>®</sup>, es el que presentó mayor actividad específica, por lo que parece el más conveniente para el proceso. Sin embargo, para la etapa de Sacarificación, si todo el almidón ya ha sido transformado en oligosacáridos en las etapas anteriores por la acción de las  $\alpha$ -amilasas, parece más razonable utilizar el cóctel 15, Accellerase de Genencor<sup>®</sup>, que fue el que presentó mayor actividad glucoamilasa. Solo en el caso de que quedaran cadenas de almidón por ser transformadas, sería razonable pensar en utilizar en la etapa de Sacarificación un cóctel que mostrara tanto  $\alpha$ -amilasa como glucoamilasa y en este caso el cóctel recomendado sería el cóctel 3, Spirizyme Fuel de Novozymes<sup>®</sup>.

### **Residuo Lignocelulósico**

Como se ha comentado en la Introducción, el etanol lignocelulósico o de segunda generación, surge para evitar, o no incrementar, el uso de materias primas que se utilizan en alimentación animal (Sun y Cheng,



2002), y cubrir los niveles de producción de etanol necesarios para cumplir las expectativas marcadas por la UE para el año 2020, en la que se establece que el 20% de la energía de los Estados debe proceder de fuentes renovables.

Una vez desestructurada la pared celular vegetal (apartado 1.6.2.1), son necesarias enzimas que hidrolicen la celulosa y el xilano hasta monosacáridos para que puedan ser fermentados. El análisis de las actividades implicadas en estas hidrólisis, encontradas en los complejos enzimáticos estudiados (**Tabla 3.1**), se comenta a continuación.

### **Hemicelulosa**

Las **actividades endoxilanasas** y  **$\beta$ -xilosidasas** fueron las actividades estudiadas implicadas en la degradación de la hemicelulosa. En los cócteles 5, Viscozyme Wheat, y 7, Viscozyme Rye, conocidos por su actividad xilanasas/endoglucanasas, se encontraron los mayores niveles de actividad  $\beta$ -xilosidasa y xilanasas. En ambos cócteles estas actividades fueron similares, pero cabe destacar que en Viscozyme Rye se encontraron mayores niveles de las actividades implicadas en la degradación de la celulosa, importante ya que para desestructurar la pared celular se necesita los dos tipos de actividades.

En los otros complejos estudiados, destacar que a pesar de no estar descritas actividades implicadas en la degradación de la hemicelulosa, en los cócteles 4, Viscozyme Barley, 6, Ultraflo y 12, NS-50030 presentaron niveles similares de endoxilanasas que Viscozyme Wheat y Viscozyme Rye aunque la actividad  $\beta$ -xilosidasa fue aproximadamente la mitad.

### **Celulosa**

Analizados los resultados de los cócteles enzimáticos relacionados con la degradación de la celulosa, el análisis comparativo puso de manifiesto que las tres actividades enzimáticas que conforman el complejo celulasa, endoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas y avicelasa, se encuentran presentes en la mayoría de los cócteles estudiados. No se detectó ninguna de estas actividades en el cóctel 1, Alcalase y estas fueron bajas o no se encontraron en el cóctel 3, Spirizyme Fuel y otros cócteles que se utilizan para la producción de etanol a partir de grano de cereal.

La **actividad endoglucanasa** destacó en el cóctel 14, Novozym 50070, conocido por su actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa (mucho mayor que la encontrada en los otros cócteles estudiados). Señalar además que otros complejos que pertenecen al denominado kit de biomasa, cóctel 10, NS-50012, y cóctel 12, NS-50030, también mostraron una actividad endoglucanasa alta. Aunque esta fue 4 veces menor que la de Novozym 50070, fue mayor que en los cócteles 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye y 15, Accellerase, complejos que se conocen por esta actividad.

La mayor **actividad  $\beta$ -glucosidasa**, se encontró en el cóctel 15, Accellerase y cóctel 9, Novozym 50010, en los que estaba descrita esta actividad, aunque también fue muy alta en el cóctel 6, Ultraflo, conocido por su actividad endoglucanasa.

La **actividad avicelasa**, resultado de la acción conjunta de todas las enzimas del complejo celulolítico, fue mayor en el cóctel 14, Novozym 50070, que también presentó la máxima actividad endoglucanasa aunque la actividad  $\beta$ -glucosidasa en este complejo no fue muy alta (30 veces menos que la encontrada en el cóctel 15, Accellerase).

Por último, la **actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa**, descrita en el cóctel 14, Novozym 50070, fue mayor en este complejo pero también se encontró en un porcentaje relativamente alto (aprox. 50%) en los cócteles 2, Liquozyme, 6, Ultraflo, 7, Viscozyme Rye, y 10, NS-50012, del kit de biomasa.

Los resultados obtenidos en este trabajo pusieron de manifiesto, que no siempre la actividad mayoritaria descrita en el cóctel comercial coincide con la mayor actividad encontrada en este, ni es la única actividad existente en el mismo.

En el caso de la biomasa lignocelulósica, los cócteles enzimáticos deberían tener tanto celulasas como xilanasas. Teniendo en cuenta nuestros resultados, los mejores cócteles con actividad xilanasas, tanto endoxilanasas como  $\beta$ -xilosidasas, son 5, Viscozyme Wheat, y 7, Viscozyme Rye, los dos conocidos por su actividad xilanasas y endoglucanasa, aunque esta última fue mucho mayor en otros cócteles. Como fuente de celulasas, elegiríamos el cóctel 14, Novozym 50070, que fue en el que encontramos mayor actividad endoglucanasa (a pesar de que no es conocido por esta actividad), suplementado con el cóctel 15,

Accelerase, o 9, Novozym 50010, cócteles con mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa. Sin embargo, en caso de que existan  $\beta$ -(1,3)-glucanos en la pared celular de la biomasa vegetal que vayamos a utilizar, convendría tener en cuenta que el cóctel 6, Ultraflo, también tiene una alta actividad  $\beta$ -glucosidasa y presenta además  $\beta$ -(1,3)-glucanasa.

#### 4.1.2 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS

El estudio de estabilidad de las actividades enzimáticas, y el pH y temperatura a la que estas presentaban mayor actividad se realizó en los primeros 9 complejos que nos proporcionó Novozymes® (**Tabla 2.4**). Dado que los demás complejos se obtuvieron en etapas avanzadas de este trabajo, tras analizar los resultados del primer estudio, consideramos que no era necesario realizarlo con los nuevos complejos, ya que al llevar todos ellos conservantes y estabilizantes se favorece la estabilidad de los mismos.

Los resultados obtenidos en la caracterización de los cócteles comerciales permitieron contrastar las condiciones de proceso usadas por la industria en las distintas etapas de producción de bioetanol y las características de las actividades estudiadas en los cócteles comerciales. Excepto la actividad proteasa, que presentó mayor estabilidad a pH básico de acuerdo con estudios previos (Ward et al., 2009), la mayoría de las actividades estudiadas, especialmente celulasas y xilanasas, presentaron los máximos de actividad entre pH 4-6, de acuerdo también con lo reportado por otros autores (Bedford, 2001; Wilson, 2009; Bajpai, 2009), y todos ellos mantuvieron niveles muy altos de actividad (~70-80% de la actividad inicial) tras 48 h de incubación a pH 5. Respecto a los estudios de estabilidad a la temperatura, destacar que aunque la estabilidad de las actividades enzimáticas fue mayor a 50 °C, a 60 °C la capacidad de hidrólisis de las enzimas se mantuvo, en la mayoría de las actividades, en torno al 60-70%, tras 48 h de incubación.

Por último, resaltar que, aunque probablemente, existen nuevos complejos en los que se hayan mejorado las diferentes actividades enzimáticas estudiadas, este estudio ha puesto de manifiesto la gran

variedad de actividades que existen en los complejos comercializados, así como su estabilidad para trabajar en las distintas condiciones de pH y temperatura que se utilizan en la producción de bioetanol a partir de grano de cereal o lignocelulosa, por lo que abre nuevas expectativas para tratar de optimizar las condiciones de proceso.



## **4.2 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE TRIGO Y CEBADA**



La producción de bioetanol de primera generación a escala industrial se realiza utilizando grano de cereales, tanto en Estados Unidos como en Europa. En EEUU la producción se lleva a cabo a partir de grano de maíz, ya que es el cereal más abundante, mientras en España se hace a partir de trigo y la cebada ya que son las materias primas más abundantes (**Tabla 4.1**).

**Tabla 4.1.** Producción de cereales en España según datos de la Asociación Agraria de Jóvenes Agricultores (ASAJA).

Cereales (tm)	06/07	07/08	08/09
Trigo	5.494.000	6.140.000	5.775.000
Cebada	8.050.000	11.100.000	9.000.000
Maíz	2.840.000	3.250.000	2.900.000
Otros cereales	900.000	1.000.000	1.300.000

Como ya se ha comentado en la Introducción (apartado 1.5.1.1), en la composición de los granos de cereales predomina el almidón aunque exista heterogeneidad en las diferentes variedades y su composición dependa no solo del genotipo, sino también de otros factores ambientales como la composición del suelo, la época de recolección y el tiempo de almacenamiento.

En este trabajo se han caracterizado dos materias primas proporcionadas por la empresa ABNT, utilizadas en el proceso de producción de bioetanol en España (apartado 2.1.1). Para su caracterización se realizaron extracciones secuenciales de las muestras (**Fig. 2.3**), obteniendo tres fracciones: fracción soluble en agua fría (SF), fracción soluble en agua caliente (SQ) y fracción insoluble o residuo (R). En todas ellas se valoró peso seco, contenido en proteína y composición glucídica. Del análisis detallado de la composición y estructura de los polisáridos contenidos en las harinas se puede obtener información específica que conduzca al mejor aprovechamiento de los azúcares potencialmente fermentables para producir bioetanol. El análisis de la estructura de los oligo- y polisacáridos de las fracciones se efectuó combinando tres técnicas principales: i) hidrólisis ácida para la



identificación y cuantificación de los monosacáridos (**Tabla 3.5**), ii) análisis de metilación, para deducir en qué posiciones esos monosacáridos se enlazan entre sí en los polisacáridos de las harinas (**Tablas 3.6 y 3.7**), y iii) espectrofotometría de infrarrojos para informarnos sobre la configuración anomérica ( $\alpha$  o  $\beta$ ) de los enlaces glicosídicos (**Fig. 3.46 y 3.47**). Las harinas no solo contienen oligo y polisacáridos, sino que también existe una porción glucídica en forma de azúcares libres (monosacáridos). Dichos azúcares son hidrosolubles y se encuentran en la fracción SF. Por ello, también se identificaron y cuantificaron los monosacáridos libres presentes en esta fracción.

La fracción SF de la harina de trigo es más abundante que la de cebada (27,9% y 12,6%, respectivamente) y además contiene mayor porcentaje de azúcares solubles. Concretamente, el contenido en glucosa libre (**Tabla 3.4**) de la fracción SF de trigo (15,2%) es cuatro veces superior al de la cebada (3,8%). Este valor, extrapolado a las harinas integrales completas, nos indica que cantidad de glucosa libre en la harina de trigo es del orden de 8 veces superior a la contenida en la harina de cebada. Además de glucosa, se detectaron pequeñas cantidades de otros monosacáridos.

La composición global de azúcares de esta fracción reveló que, además de los azúcares libres, existe una cierta proporción de material oligosacarádico o pequeños polisacáridos, más abundante en la harina de cebada. Esto se demuestra por el incremento de la proporción de glucosa liberada tras la hidrólisis ácida de la fracción SF de ambas harinas, que se elevó hasta el 26,9 % en el caso del trigo y hasta el 28,8% en la cebada (**Tabla 3.5**). La mayor parte de los oligosacáridos de la fracción SF serían cadenas cortas de almidón, ya que en el análisis estructural (espectrometría de infrarrojos) se detectaron los derivados correspondientes a este polímero, cadenas de  $\alpha$ -(1,4)-glucosa parcialmente ramificadas por unidades únicas de glucosa. La presencia de (1,4)-xilosa y (1,3)-arabinosa en las fracciones SF demuestra que junto con los oligómeros de almidón se extrae parte de un arabinoxilano característico de pared celular de cereales (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Este componente es abundante en la fracción obtenida de trigo, mientras que en la de cebada es poco representativo. Sin embargo, un componente específico de la cebada, que no se detectó en la fracción

SF del trigo, ni siquiera en cantidades residuales, es la  $\beta$ -(1,3) glucosa (12,2%). La presencia de  $\beta$ -(1,3)-glucanos en la harina de cebada ha sido previamente descrita (Oscarsson et al., 1996). Todos estos compuestos simples (monosacáridos libres y oligosacáridos), detectados en la fracción de la harina soluble en agua fría, pueden proceder de la rotura y degradación, tras la etapa de molienda, del almidón y los arabinoxilanos solubles de la pared celular del endospermo.

La fracción SQ, soluble en agua caliente, es el componente mayoritario en ambas harinas, siendo ligeramente superior en la de cebada que en la de trigo (66,6 y 60,6%, respectivamente). Todos los análisis realizados corroboran que en esta fracción se extrae el almidón que se acumula en los granos de ambos cereales. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Oscarsson et al., 1996).

La cantidad de residuo (R) fue mayor en cebada que en trigo (20,3% y 9,3%, respectivamente). La composición y estructura de esta fracción en las dos harinas es característica de una mezcla de polímeros estructurales, tales como celulosa y hemicelulosa (arabinoxilano), que son las fibras mayoritarias presentes en el salvado de cereal (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). La cantidad de lignina y pectinas en este material es escasísima, ya que solo se detectaron trazas de ambos componentes en los análisis químicos realizados. El alto contenido en fibra de la harina integral de cebada, especialmente de  $\beta$ -glucanos, como la celulosa, es un hecho ampliamente documentado en la bibliografía (Fraser y Holmes, 1959; Primo, Y.E., 1982; Wrigley, C., 2004).

Estos análisis confirmaron el alto porcentaje de azúcares fermentables presentes tanto en el grano de trigo como el de cebada y corroboran la necesidad de utilizar cócteles enzimáticos que contengan fundamentalmente amilasas, como el cóctel 2, Liquozyme, en el proceso de producción de bioetanol a partir de grano de trigo. Sin embargo, la presencia de arabinoxilanos en la fracción soluble y en el residuo, especialmente en el caso de la cebada, indica que sería muy conveniente el uso de hemicelulasas para facilitar la accesibilidad a la celulosa y otros  $\beta$ -glucanos contenidos en la harina. De los complejos enzimáticos estudiados en el capítulo 3.1 de este trabajo, serían útiles para este fin los cócteles 5, Viscozyme Wheat, 6, Ultraflo y 7, Viscozyme Rye, con actividades endoglucanasa y xilanasa. La optimización del

proceso de bioetanol a partir de grano de cereales, aprovechando mejor la celulosa y hemicelulosa, permitiría también aumentar la calidad del coproducto final del proceso (DDGS), compuesto proteínico que se utiliza como alimento animal.

Puesto que la cantidad de lignina Klason en la fracción residual sólida (R) es muy escasa, tanto en el grano de trigo como en el de cebada, se descarta el uso de enzimas ligninolíticas en el proceso de producción de bioetanol a partir de grano de cereal ya que no contribuiría a mejorar el rendimiento del proceso. El uso de estas enzimas se podría valorar en futuros estudios en los que la materia prima fuese paja de distintos cultivos herbáceos como paja de trigo, donde la proporción de lignina es muy significativa (Buranov y Mazza, 2008).

### **4.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS DOSIS DE ENZIMAS NECESARIAS PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE GRANO DE TRIGO**



En este capítulo se estudió la posibilidad de optimizar las dosificaciones de los cócteles comerciales para la producción de bioetanol a partir de grano de trigo, con la finalidad de aumentar la concentración final de glucosa obtenida tras la hidrólisis del almidón y por tanto el porcentaje final de etanol. Este estudio resultó ser de especial interés ya que, además de tratar de optimizar las dosis de los cócteles que usualmente se utilizan, se ensayaron otros posibles nuevos cócteles alternativos.

A continuación se comentan los resultados obtenidos en el proceso de producción de etanol, realizado en el laboratorio, utilizando diferentes cócteles enzimáticos, y distintas dosis de estos, en cada una de las etapas del proceso.

### **Etapas de Mezcla**

A nivel industrial, en esta primera etapa, tal y como se comentó en la Introducción (apartado 1.5.3.1), se añaden  $\alpha$ -amilasas para hidrolizar parcialmente el almidón y disminuir la viscosidad de la mezcla, lo que facilita el paso de la materia prima a través de los equipos de bombeo de la planta.

En el laboratorio, esta etapa se realizó imitando las condiciones de proceso. En este tratamiento se obtuvieron dos fracciones, mezcla líquida y sólida, que se analizaron por separado. Los resultados mostraron que el peso de la fracción líquida va aumentando, a expensas de la disminución de la sólida, ya que al hidrolizar las  $\alpha$ -amilasas el almidón del grano este se convierte en moléculas más pequeñas, mucho más solubles.

El análisis de las sustancias reductoras en estas fracciones (**Fig. 3.48**), puso de manifiesto que, aunque inicialmente se ve un aumento de las sustancias reductoras liberadas según aumenta la dosis de enzima, a partir de 0,079 mg/g harina la cantidad de azúcares liberados no es significativa. Estos resultados se corroboraron tras analizar la glucosa de las dos fracciones obtenidas en la etapa de Mezcla (incluyendo también la glucosa que procede de la hidrólisis de los oligosacáridos y polisacáridos de estas fracciones). Por estas razones, la concentración 0,079 mg de Liquozyme por gramo harina de trigo fue la seleccionada para continuar la optimización de la dosis enzimática en la etapa de Licuefacción.

### **Etapas de Licuefacción**

Tras la etapa de Mezcla, en el proceso industrial el mosto se trata a alta presión y temperatura (apartado 1.5.3.2) para favorecer el fraccionamiento del almidón. Después se atempera, se pasa al tanque de licuefacción, y se añade de nuevo  $\alpha$ -amilasas, para completar la hidrólisis del almidón, y otros cócteles con actividades celulasa y xilanasas, que actúan sobre los componentes minoritarios del grano, para facilitar la hidrólisis de este polisacárido. En el laboratorio, tal y como está descrito en Materiales y Métodos (apartado 2.6.2), se sustituyó el proceso de tratamiento a alta temperatura y presión, antes de añadir las enzimas, por un proceso de autoclavado. Con este tratamiento se consiguió, solo en parte, alterar la estructura de los granos del cereal pero esto fue suficiente para comparar los efectos de los diferentes cócteles enzimáticos.

En un primer experimento se añadieron solo  $\alpha$ -amilasas (cóctel 2, Liquozyme) y luego  $\alpha$ -amilasas suplementadas con el cóctel 5, Viscozyme Wheat, con actividad endoglucanasa/xilanasas, y se valoraron tanto el peso de las fracciones obtenidas (líquida y sólida) como su contenido en azúcares. Los resultados mostraron que la mayor liberación de azúcares (fracción líquida) tiene lugar cuando el cóctel con  $\alpha$ -amilasa se suplementa con endoglucanasa/xilanasas. Este resultado se explica porque estas enzimas hidrolizan la celulosa y hemicelulosa, presente en la cascarilla del grano, facilitando la hidrólisis del almidón y por tanto la liberación de azúcares procedentes de estos polisacáridos.

Dado que se habían caracterizado otros cócteles con actividad endoglucanasa/xilanasas, 6, Ultraflo, y 7, Viscozyme Rye, se ensayaron también estos dos cócteles en esta etapa. No se detectaron diferencias significativas en la cantidad de glucosa liberada (g/g harina), cuando se utilizaron las mismas unidades de endoglucanasa en los tres cócteles. Cabe destacar que esta actividad se corresponde con una menor dosis de proteína en estos dos nuevos cócteles y, si esto se llegara a implementar en el proceso industrial, podría ser un importante ahorro de proteína en esta etapa y, por tanto, repercutir positivamente en el coste global del proceso.

En los últimos años se está avanzando mucho en la mejora de los cócteles que se utilizan en la producción de etanol a partir de biomasa. Recientemente ha aparecido una nueva generación de enzimas entre las que se encuentra el cóctel 14, Novozym 50070, descrito como  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, que presenta valores de actividad endoglucanasa muy superiores al resto de complejos analizados. Aunque se ha caracterizado este complejo (apartado 3.1.1) no se ha probado su efecto en la etapa de Licuefacción, por lo que consideramos conveniente ensayarlo en esta etapa para ver si se podría también contribuir a optimizar el proceso.

Tras los resultados obtenidos en esta etapa utilizando diferentes dosis de los complejos con actividad endoglucanasa/xilanasas, se seleccionó para realizar la etapa de Licuefacción el tratamiento con el cóctel 2, Liquozyme, con  $\alpha$ -amilasa (0,198 mg/g harina) y los tres complejos con actividad endoglucanasa 5, 6 y 7 utilizando la dosis de 2,5 U de actividad endoglucanasa por g de harina en todos los casos.

### **Etapas de Sacarificación**

Esta etapa es necesaria para que se libere glucosa de los polisacáridos parcialmente degradados en etapas anteriores que se han convertido, por las hidrólisis enzimáticas previas, en maltosas, maltotriosas y dextrinas (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

A nivel industrial (1.5.3.3), se tiende a realizar este proceso conjuntamente con la fermentación, denominándose *SSF*. En el laboratorio, estas etapas se realizaron independientemente, a fin de obtener más información sobre la acción de los complejos enzimáticos y tratar así de optimizar la dosificación.

En esta etapa se adicionó el cóctel 3, Spirizyme Fuel, con actividad glucoamilasa (0,409 mg/g harina) a las muestras seleccionadas en la etapa de Licuefacción. Tras los tratamientos enzimáticos ensayados, como en las etapas anteriores, se determinó el peso, azúcares libres y contenido de glucosa (g/g harina) en las distintas fracciones. Al comparar las sustancias reductoras obtenidas con los distintos cócteles utilizados, no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, en todos los casos sí se apreció un aumento muy significativo, en torno al 50%, respecto al control, tanto en las sustancias reductoras como en la glucosa en esta etapa. Esto indica la importancia de la actividad



glucoamilasa para completar la hidrólisis de los oligosacáridos del almidón a glucosa.

En los últimos años, como se ha comentado anteriormente, se está haciendo un gran esfuerzo por empresas que comercializan cócteles para obtener etanol a partir de biomasa lignocelulósica, principalmente Novozymes® y Genencor®. Destacar el cóctel 14, Novozym 50070, con actividad descrita  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, que presentó los mayores niveles de endoglucanasa (U/mg) y el cóctel 15, Accellerase, con actividad descrita  $\beta$ -glucosidasa/endoglucanasa, donde se detectaron los mayores niveles de glucoamilasa (mU/mg). Estos cócteles no se ensayaron en las respectivas etapas de Licuefacción y Sacarificación porque se obtuvieron tras terminar este estudio.

### **Etapas de Fermentación**

En la industria esta etapa se realiza inoculando la levadura *S. cerevisiae*, previamente crecida en un medio de propagación, al mosto procedente de la etapa de Licuefacción. En el laboratorio, se añadieron al mosto las levaduras, reconstituidas en un medio salino (apartado 2.2.2), se dejó incubando 40 h y luego se cuantificó, mediante GC, el etanol liberado (apartado 2.5.6). Los resultados obtenidos, de acuerdo con la etapa de Sacarificación, pusieron de manifiesto que partiendo de cantidades de glucosa similares (g/g harina) el porcentaje de etanol fue el mismo utilizando los diferentes cócteles.

A pesar de que actualmente el proceso de Sacarificación y Fermentación se realiza en la industria simultáneamente (Lin y Tanaka, 2006; Nikolic et al., 2009), el experimento realizado en el laboratorio ha permitido comprobar la eficacia de los nuevos cócteles enzimáticos en la producción de etanol. Por último, es necesario señalar que, para decidir los cócteles más idóneos para el proceso, sería preciso elaborar un estudio económico que nosotros no hemos podido desarrollar, por que se ha trabajado a partir de muestras cedidas por las casas comerciales para su evaluación.

#### **4.4 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE PAJA DE TRIGO: APLICACIÓN DE LACASAS FÚNGICAS EN EL PROCESO**



Como se ha comentado en la Introducción, para evitar el impacto que puede tener la producción de etanol 1G en la producción de grano para alimentación animal, se está potenciando fuertemente la búsqueda de métodos competitivos para producir etanol 2G utilizando residuos lignocelulósicos. Dado que la paja de trigo es un residuo muy abundante (Lin y Tanaka, 2006) y en España el trigo es uno de los cereales que se cultiva mayoritariamente (**Tabla 4.1**), podría ser esta una alternativa interesante para producir bioetanol 2G. La complejidad estructural del material lignocelulósico hace imprescindible un primer paso de pretratamiento para eliminar esta lignina y facilitar el acceso de las enzimas a los polisacáridos de la pared vegetal. Uno de los pretratamientos más utilizados para conseguir este efecto es el proceso de *steam explosion*, utilizando vapor de agua o ácido sulfúrico diluido (apartado 1.6.2.1).

Es conocido que las lacasas de los basidiomicetos oxidan los fenoles libres produciendo radicales que evolucionan provocando la polimerización de estos compuestos y detoxificando residuos agrícolas (Saparrat et al., 2010; Díaz et al., 2010). Por esta razón, estudiamos el posible papel de esta enzima en la paja de trigo pretratada mediante *steam explosion*, con y sin ácido, y optimizamos las condiciones del tratamiento.

#### **4.4.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LACASAS EN LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

Inicialmente, utilizando las lacasas de *C. rigida* y *T. villosa*, los tratamientos se realizaron a distintos pH, con el fin de evaluar el efecto del pH en la reducción de fenoles existentes en los prehidrolizados de *slurry* agua y *slurry* ácido. El contenido de fenoles libres detectados en las muestras control fue mayor en las muestras de los *slurries*, obtenidos con agua y ácido, tras tratar con las lacasas a pH 4 y pH 5. En el caso del *slurry* ácido la cantidad de fenoles libres fue menor que en el *slurry* agua a estos pH. Estudios realizados con paja de maíz y trigo pretratados mediante *steam explosion* indican que el contenido de fenoles en la fase acuosa tiende a llegar a un máximo a medida que las condiciones de pretratamiento son más severas (Zhang et al., 2008; Hongqiang y Hongzhang, 2008). Esto explicaría el menor contenido

fenólico en el prehidrolizado de *slurry* ácido, donde el ácido sulfúrico que se usa como catalizador proporcionaría unas condiciones más severas durante el proceso de *steam explosion*. Sin embargo, existen resultados contradictorios que muestran que el contenido de lignina ácido insoluble en el residuo sólido después de la *steam explosion* es mayor a medida que aumentan la severidad del pretratamiento realizado (Ballesteros et al., 2006a; Kabel et al., 2007) y, por lo tanto, como consecuencia de esto podrían aumentar los fenoles libres.

En el caso del *slurry* obtenido con vapor de agua, la solubilización de los compuestos fenólicos en las muestras control fue mayor a medida que aumentaba el pH. Sin embargo, en los controles de *slurry* ácido, las condiciones de pH no afectaron la solubilización de compuestos fenólicos. Esto sugiere que los compuestos fenólicos liberados durante el proceso de *steam explosion* en el *slurry* ácido están totalmente solubilizados a pH 3 mientras que la solubilización de los compuestos fenólicos del *slurry* con agua mejora a medida que aumenta el pH.

El tratamiento con lacasas redujo un 75% y 70% el contenido de fenoles en las muestras de los *slurries* obtenidos con agua y ácido, respectivamente. El origen de la lacasa, de *C. rigida* o *T. villosa*, no produjo diferencias significativas en los resultados.

Para optimizar la dosis de lacasa en los tratamientos se escogió pH 5, por ser el pH al que suelen ser estables la mayoría de las celulasas y hemicelulasas que tienen que utilizarse en el proceso de obtención de bioetanol 2G. La dosis de enzima que se seleccionó para realizar los experimentos, 0,5 U/mL de lacasas es una dosis razonablemente baja para poder escalar el proceso y detoxificar la paja.

Los ensayos de cromatografía de exclusión molecular de las muestras tratadas con lacasa mostraron que el contenido en fenoles libres del prehidrolizado disminuye, apareciendo compuestos de mayor peso molecular. Esto tiene lugar probablemente porque la oxidación de los fenoles libres por la lacasa da lugar a radicales fenoxilo que tienden a polimerizar, como ha sido descrito previamente en la detoxificación de residuos generados en la producción de aceite de oliva (Jaouani et al., 2005).

#### 4.4.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LACASAS EN EL CONTENIDO EN AZÚCARES LIBRES Y LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El análisis de monosacáridos presentes en el prehidrolizado de los dos tipos de *slurries* estudiados, puso de manifiesto que el uso de lacasas no afecta la liberación de azúcares. De estos resultados se deduce también que la cantidad de glucosa, xilosa y arabinosa recuperada tras la *steam explosion* ácida fue mayor, presentando estas muestras un gran incremento en xilosa, debido a la mayor solubilización de las hemicelulosas a pH ácido. Estos resultados coinciden con otros estudios que muestran que las condiciones severas durante el pretratamiento de *steam explosion* (altas temperaturas, largo tiempo de residencia y condiciones ácidas) aumentan la solubilización de la hemicelulosa en el prehidrolizado (Yang y Wyman, 2004; Saha et al., 2005; Ballesteros et al., 2006a; Kabel et al., 2007).

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando la fracción sólida del *slurry* tras separar el prehidrolizado. Ya se había estudiado la aplicación de lacasas, tras la hidrólisis enzimática, en la producción de etanol a partir de residuos de caña de azúcar y madera (Jönsson et al., 1998; Palonen y Viikari, 2004; Chandel et al., 2007). Sin embargo, es interesante comparar el efecto de las lacasas en la hidrólisis del material, antes y después de tratar con celulasas, con el fin de evaluar los efectos del tratamiento tanto en la etapa de hidrólisis como en la fermentación.

Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron que los tratamientos realizados con lacasas antes de la hidrólisis enzimática con celulasas producían una menor recuperación de glucosa con los dos tipos de *slurries* ensayados. Otros autores han descrito la inhibición de cócteles enzimáticos con actividad celulasa, xilanasas y feruloil esterasa en *slurry* de paja de trigo tratado con lacasas (Tabka et al., 2006), lo que podría explicar nuestros resultados. En otros estudios, la baja recuperación de glucosa tras el tratamiento con lacasas se relaciona con la liberación de compuestos fenólicos durante la *steam explosion* y la posible inhibición que estos podrían producir sobre las enzimas que degradan la pared celular vegetal (Akin et al., 1996; Gamble et al., 2000). Sin embargo, en estudios realizados con madera de coníferas, también tratada con *steam explosion*, la hidrólisis de la celulosa mejoró tras el tratamiento con lacasas (Palonen y Viikari, 2004), explicando los autores en este caso dicho resultado por una posible disminución en las uniones

de las celulasas a la lignina, mediado por un aumento de la hidrofobicidad de la superficie de la lignina tras el tratamiento con las lacasas.

#### 4.4.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LACASAS EN EL CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS Y LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Con la finalidad de evaluar el efecto de la reducción de los fenoles sobre el proceso de fermentación, se analizó también el efecto del tratamiento con lacasa en los *slurries* obtenidos con vapor de agua y ácido sobre el crecimiento de las levaduras (**Fig. 3.74**) y en la producción de etanol (**Fig. 3.75**). La fermentación mejoró considerablemente tras la detoxificación con lacasas. Después de tres días de incubación con *S. cerevisiae*, los resultados mostraron que la concentración de levaduras, el consumo de azúcar y la producción de etanol son más altos en las muestras tratadas con lacasas que en los controles.

El efecto positivo del tratamiento con lacasas sobre el crecimiento de las levaduras ya se había demostrado utilizando otros materiales lignocelulósicos (Jönsson et al., 1998; Palonen y Viikari, 2004; Martin et al., 2007). Según Palmqvist (1999), la inhibición del crecimiento de la levadura tiene lugar por una disminución en la capacidad de la membrana de la levadura que sirve como barrera selectiva frente a los fenoles y esto afectaría la asimilación del azúcar y, por tanto, el crecimiento de la misma.

El mayor rendimiento de etanol en las muestras de *slurry* de paja tratado con lacasas se obtuvo en el *slurry* obtenido con vapor de agua. La polimerización de los fenoles libres, detoxificando el *slurry*, permitió que las levaduras crecieran mejor. En el caso de *slurry* obtenido con vapor de agua, la producción de etanol fue casi 3 veces superior a las muestras control tratadas en las mismas condiciones.

A pesar de que en condiciones de *steam explosion* ácida la liberación de azúcares fue mayor que en las muestras pretratadas con vapor de agua, el efecto de las lacasas fue menor (aproximadamente el doble de la producción de etanol, respecto al control). Esto podría explicarse, según indican otros autores, por la presencia de más inhibidores en condiciones de *steam explosion* más severas (Ballesteros et al., 2006a;

Kabel et al., 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la disminución de fenoles libres tras el tratamiento con lacasa parece influir más en la conversión de etanol que en el crecimiento de las levaduras, ya que los recuentos de estas no fueron significativamente diferentes al comparar los *slurries* ácido y agua tras el tratamiento con lacasa.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que las lacasas tienen un papel importante para aumentar el rendimiento del proceso de producción de bioetanol 2G. En este estudio solo se ha considerado la fermentación de la glucosa, que procede de la hidrólisis de la celulosa, por *S. cerevisiae*, una levadura muy resistente capaz de crecer en presencia de los inhibidores liberados durante el proceso de *steam explosion*. Cabe destacar que, aunque actualmente existen levaduras capaces de fermentar la xilosa (Hahn-Hägerdal et al., 2007), estas no son capaces de fermentar este azúcar presente en el prehidrolizado de la paja tratada por *steam explosion* ácida. Aunque muchos estudios van encaminados a encontrar levaduras capaces de fermentar la xilosa en presencia de inhibidores, el tratamiento con lacasa en la fermentación de pentosas podría jugar un papel esencial para favorecer el crecimiento y fermentación de los C5 por estas levaduras.





## **4.5 PERSPECTIVAS FUTURAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL 2G**



Conseguir implementar las tecnologías de producción de bioetanol, a partir de biomasa lignocelulósica, requiere grandes esfuerzos. Existen muchos proyectos en curso para poner a punto estas tecnologías, pero todavía la producción industrial de este tipo de alcohol es muy limitada porque existen cuellos de botella en el proceso de producción que tienen que resolverse.

En Europa, en el año 2006, se creó la *European Biofuels Technology Platform* (<http://www.biofuelstp.eu/>), con el fin de coordinar y contribuir al desarrollo sostenible de todas las tecnologías relacionadas con la producción de energía renovable que permitan cumplir los objetivos marcados, en la directiva 2009/28/CE, para el año 2020.

La producción a nivel industrial de etanol en este momento, como se ha comentado en el apartado 1.4, procede de caña de azúcar, remolacha o grano de cereales (Lechón et al., 2006; Sánchez y Cardona, 2008; Schwietzke et al., 2009). Aunque esta tecnología puede seguir utilizándose, para cumplir los objetivos propuestos para el sector transporte en el año 2020, es importante buscar materias primas alternativas que no interfieran con la cadena alimentaria y produzcan altos rendimientos.

#### **4.5.1 TENDENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL 2G**

En la actualidad, ya existen plantas piloto de bioetanol obtenido de biomasa lignocelulósica, como es el caso de la fábrica con tecnología híbrida que ABNT tiene en Salamanca, pero todavía es necesario mejorar algunos puntos del proceso para conseguir producir industrialmente, con altos rendimientos, este alcohol. Por esta razón es muy difícil predecir con certeza el tiempo necesario para el desarrollo industrial de esta tecnología.

Como se ha comentado en el apartado 4.1, ya existen complejos enzimáticos comercializados para biomasa lignocelulósica pero todavía queda un margen importante para mejorar el rendimiento de azúcares fermentables de estos materiales. Los mayores esfuerzos, hasta este momento, se han centrado en suplementar los cócteles con enzimas celulolíticas, principalmente con actividad  $\beta$ -glucosidasa, con el fin transformar la celobiosa y los oligosacáridos procedentes de la degradación de la celulosa en glucosa y que las levaduras,

principalmente del género *S. cerevisiae*, la fermenten hasta etanol. Muchos de los complejos enzimáticos comercializados como celulasas proceden de hongos del género *Trichoderma* y están suplementados con  $\beta$ -glucosidasas producidas por otros hongos (Duff et al., 1986; Juhász et al., 2005).

A nivel industrial, destaca el uso de la levadura *S. cerevisiae* para fermentar todo tipo de hexosas y dar rendimientos muy elevados en la obtención de etanol (apartado 1.5.3.3). Esta levadura es capaz de soportar niveles relativamente altos de los inhibidores generados durante la etapa de *steam explosion* aunque si estos disminuyen (por ej. tras tratamiento con lacasa), la levadura crece mucho mejor y produce más etanol. No existen actualmente cepas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar eficazmente las pentosas.

Otro aspecto importante a considerar en el proceso de producción de etanol 2G es que la biomasa lignocelulósica contiene entre 15-30% de pentosas y la fermentación de estos azúcares es esencial para conseguir un rendimiento eficaz en la producción de este etanol (Tomás-Pejó, 2010). Por esta razón, los cócteles enzimáticos para biomasa deben tener también xilanasas que permitan transformar todos los azúcares de las hemicelulosas en azúcares fermentables por las levaduras.

La composición de la hemicelulosa varía según el tipo de planta y en angiospermas está constituida principalmente por xilano (Fengel y Wegener, 1984). Dado que la paja de trigo o cebada son los materiales mayoritarios en España y Europa para producir bioetanol 2G, las xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas son también enzimas esenciales para completar el proceso.

La mayoría de los hongos productores de celulasas, como los del género *Trichoderma*, secretan xilanasas pero también en este caso es necesario buscar cócteles más eficaces suplementados, especialmente con  $\beta$ -xilosidasa, que permita transformar la xilobiosa y oligosacáridos procedentes de la degradación del xilano en xilosa (Polizeli et al., 2005; Tabka et al., 2006).

Sin embargo, para aprovechar este azúcar son necesarios microorganismos capaces de fermentar eficazmente las pentosas. Como se describió en el apartado 1.6.2.3, existen algunas cepas de bacterias y levaduras capaces de fermentar pentosas en medios sintéticos (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Van Vleet y Jeffries, 2009), pero estos

microorganismos no pueden fermentar la xilosa presente en material lignocelulósico pretratado con *steam explosion*, probablemente debido a los inhibidores generados durante el proceso. Además, estos microorganismos presentan otros problemas adicionales para su aplicación en el proceso industrial porque toleran bajas concentraciones de etanol en el medio, son sensibles a cambios de pH y, en el caso de las levaduras, requieren condiciones microaerófilas para su crecimiento (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

Como se deduce de los apartados anteriores, quedan muchos problemas por resolver, pero en caso de conseguir microorganismos que fermenten las hexosas y pentosas del *slurry* eficazmente, la fermentación se debería realizar en las condiciones óptimas para que estas cepas adaptadas pudieran fermentar los azúcares.

Con la intención de sacar mayor rendimiento al proceso, y reducir las etapas y tanques de fermentación, la solución más eficaz sería conseguir, mediante ingeniería genética, microorganismos que pudieran fermentar tanto la glucosa como la xilosa. En este sentido, destacar que ya existen cepas de *S. cerevisiae*, en las que se han introducido genes de rutas metabólicas de fermentación de pentosas (Chu y Lee, 2007) e incluso cepas patentadas para su uso en procesos de obtención de etanol lignocelulósico (Wahlbom et al., 2008). Sin embargo, aunque los resultados son prometedores, a nivel industrial todavía no se han conseguido levaduras capaces de realizar el proceso de sacarificación y co-fermentación y, aunque esto sería muy deseable, las investigaciones se encuentran en una fase muy preliminar (Galbe et al., 2005; Lynd et al., 2005; Gray et al., 2006).

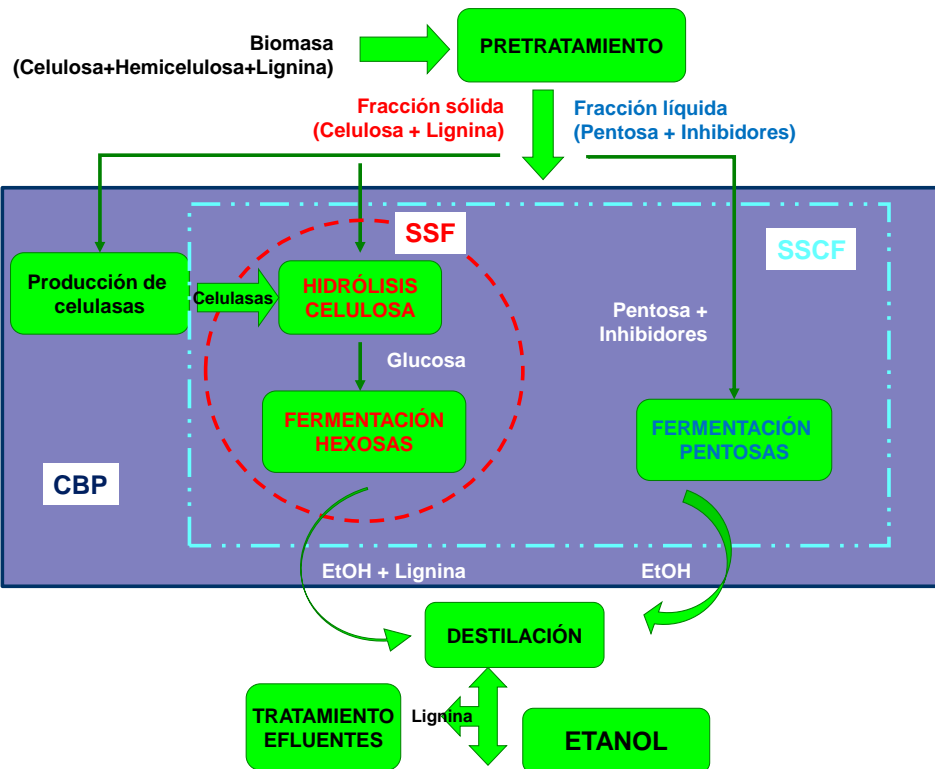
Para optimizar el rendimiento en la fermentación también sería necesario mejorar otros aspectos del proceso, como por ejemplo tratar de disminuir la presencia de inhibidores generados durante el pretratamiento de *steam explosion* del material lignocelulósico (Ballesteros et al., 2006b). Aunque hemos demostrado en este trabajo, que aplicando lacasas en el proceso se reduce la presencia de inhibidores que fundamentalmente inhiben el crecimiento de las levaduras (Jurado et al., 2009), es necesario también seguir investigando en nuevos tratamientos del material lignocelulósico que eviten la presencia de estos, y, en paralelo, buscar cepas de levaduras que puedan tolerar estos compuestos y fermentar eficazmente los azúcares.

#### 4.5.2 POSIBLES MODELOS DE INTEGRACIÓN DE LAS DISTINTAS ETAPAS DE PROCESO

En lo referente a la mejora técnica del proceso, en la actualidad se están evaluando diferentes configuraciones, teniendo en cuenta aspectos técnicos, económicos y medioambientales, para escoger aquella que permita obtener mayor rendimiento de etanol 2G.

Hasta el momento, tras el pretratamiento, solo es viable a nivel industrial realizar la etapa de Sacarificación y Fermentación de la glucosa utilizando la levadura *S. cerevisiae* (apartado 1.6.2.3).

Cuando se consigan levaduras capaces de fermentar la xilosa del *slurry* eficazmente, una posible y primera configuración de proceso incluiría la fermentación de la glucosa y la pentosa separadamente, utilizando **dos tanques** distintos de **fermentación**, ya que la xilosa quedaría en el prehidrolizado y la celulosa permanecería en la biomasa pretratada. Una segunda configuración más avanzada, podría realizarse cuando se consigan levaduras que fermenten eficazmente los dos azúcares, glucosa y xilosa, permitiendo entonces llevar a cabo la etapa de **Sacarificación** y **Co-Fermentación** en un **mismo tanque**. Aunque la configuración más deseable para las empresas que producen bioetanol, y que podemos considerar como tercera configuración, sería un **proceso** completamente **integrado**. Es decir que, en la misma planta tuviera lugar la producción de enzimas, la sacarificación y la fermentación simultánea de pentosas y hexosas. La **Figura 4.1**, muestra un esquema, de las posibles configuraciones que se han mencionado y en un futuro podrían ser utilizadas por la industria para producir etanol 2G.



**Fig. 4.1.** Diagrama teórico de producción de bioetanol a partir de biomasa. Se muestran las distintas posibilidades de proceso: **SSF**: proceso de sacarificación y fermentación simultánea, **SSCF**: proceso de sacarificación y co-fermentación simultánea y **CBP**: bioproceso integrado o consolidado; adaptado de (Cardona y Sanchez, 2007).

Como puede deducirse de este último apartado, existen en vías de desarrollo muchas investigaciones para mejorar el proceso de producción de bioetanol lignocelulósico de una manera viable desde el punto de vista industrial. Aunque ya hay plantas piloto que indican que puede conseguirse, todavía queda mucho camino por recorrer y son necesarios muchos esfuerzos, a partir de vías de investigación muy diferentes, para alcanzar los objetivos marcados por la UE de producción de etanol para el año 2020. En las directivas de la UE se contempla no incrementar la producción de este alcohol fabricado a partir de productos que interfieran con la cadena alimentaria, por lo que es imprescindible continuar el desarrollo de todas las tecnologías que permitan conseguir la producción industrial de etanol lignocelulósico.





## **4.6 CONCLUSIONES**



1. La caracterización detallada de diferentes cócteles comerciales, con actividades enzimáticas necesarias para la producción de bioetanol de primera o segunda generación, permitió confirmar las actividades mayoritarias descritas por las casas comerciales y detectar otras que deberían tenerse en cuenta en los procesos de producción.
2. Todos los cócteles enzimáticos estudiados presentaron una alta estabilidad frente a temperatura y pH. Las actividades estudiadas fueron mayores a 50 °C, decreciendo estas a medida que la temperatura fue aumentando. Respecto al pH, todas las actividades fueron estables en un rango que osciló entre 4 y 6, excepto las proteasas que tuvieron mayor actividad a pH básico.
3. La caracterización de los granos de trigo y cebada, utilizados en España para producir etanol de primera generación, puso de manifiesto el alto porcentaje de azúcares fermentables presentes en ambos cereales. La proporción de azúcares libres fue mayor en trigo aunque los dos cereales mostraron semejante porcentaje de almidón. El contenido en lignina, tanto en trigo como en cebada fue muy bajo, por lo que no parece aconsejable utilizar enzimas ligninolíticas en el proceso para aumentar el rendimiento.
4. Los tratamientos realizados para optimizar las etapas de Mezcla y Licuefacción en la producción de etanol de primera generación, utilizando grano de trigo, corroboraron que además de  $\alpha$ -amilasas en estas etapas, para aumentar el rendimiento del proceso es necesario añadir en la etapa de Licuefacción cócteles que presenten actividad endoglucanasa y xilanasa.
5. El cóctel más utilizado a nivel industrial, con actividad endoglucanasa y xilanasa, es Viscozyme Wheat. En este trabajo se han encontrado dos cócteles alternativos que permiten reducir la cantidad de enzima por gramo de harina, Ultraflo y Viscozyme Rye. Los resultados obtenidos indican que el uso de estos nuevos cócteles a nivel industrial podría suponer una reducción de costes

del proceso, aunque sería necesario tener en cuenta el precio de estos cócteles comerciales en el mercado.

6. Las condiciones de severidad aplicadas en el pretratamiento de *steam explosion*, en paja de trigo, para obtener bioetanol de segunda generación, afectan al contenido en fenoles de la paja pretratada. En el proceso de *steam explosion* en presencia de ácido se solubiliza la xilosa y esto permite también una mayor recuperación de glucosa.
7. La aplicación de lacasa en el proceso de producción de etanol de segunda generación, utilizando paja de trigo pretratada mediante *steam explosion*, condujo a la polimerización de los fenoles liberados durante el pretratamiento. En estas condiciones el crecimiento de las levaduras fue mayor y esto se tradujo en un incremento en la producción de etanol a partir de la glucosa fermentada por *S. cerevisiae*.
8. El efecto de la lacasa fue mayor en el tratamiento de *slurry* obtenido con vapor de agua que con ácido (incremento de 2,7 veces y 2 veces, respectivamente), probablemente debido a la mayor concentración de inhibidores en el *slurry* ácido.
9. Los tratamientos con lacasa de los *slurries* de paja de trigo, obtenidos con vapor de agua o ácido, mostraron la ventaja de utilizar esta enzima para incrementar la producción de etanol a partir de glucosa. El tratamiento con lacasas puede ser mucho más importante cuando se trate de fermentar la xilosa del *slurry* ácido, ya que hasta el momento no existen microorganismos capaces de hacerlo, y abre nuevas expectativas de futuro para que todos los azúcares de la lignocelulosa puedan ser fermentados hasta etanol.

## **5. BIBLIOGRAFÍA**



- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A. y Gübitz, G.M., 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3357-3362.
- Akin, D.E., Morrison, W.H., Rigsby, L.L., Gamble, G.R., Sethuraman, A. y Eriksson, K.E.L., 1996. Biological delignification of plant components by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Anim. Feed Sci. Tech.* 63: 305-321.
- Alcalde, M., 2007. Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications. En "Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications" (Polaina, J. y MacCabe, A.P. eds), Springer, Berlin, pp. 459-474.
- Almansa, E., Kandelbauer, A., Pereira, L., Cavaco-Paulo, A. y Guebitz, G.M., 2004. Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems. *Biocatal. Biotransform.* 22: 315-324.
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Liden, G. y Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82: 340-349.
- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D. y Hadar, Y., 1998. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS Lett.* 438: 195-200.
- Arias, M.E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S. y Hernández, M., 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1953-1958.
- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U. y Legge, R.L., 2007. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus*



- subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering* 79: 950-955.
- Aust, S.D. y Benson, J.T., 1993. The fungus among us-use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 101: 232-233.
- Bajpai, P., 2009. Xylanases. En "Encyclopedia of Microbiology" (Moselio, S. ed.), Academic Press, Oxford, pp. 600-612.
- Balat, M., Balat, H. y Íz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 551-573.
- Balat, M. y Balat, H., 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy* 86: 2273-2282.
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 215-242.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Manzaneres, P., Oliva, J.M., Saez, F. y Ballesteros, M., 2006a. Ethanol production from steam explosion pretreated wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 496-508.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Manzaneres, P., Oliva, J.M., Sáez, F. y Ballesteros, M., 2006b. Steam explosion pretreatment for cereal conversion to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 496-508.
- Bamaga, O., Thakur, M. y Verma, M., 2003. Assessment of cereal straw availability in combine harvested fields and its recovery by baling. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America* 34: 53-58.
- Bao, W., Lyman, E. y Renganathan, V., 1994. Optimization of cellobiose dehydrogenase and  $\beta$ -glucosidase production by cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 642-646.

- Baratto, L., Candido, A., Marzorati, M., Sagui, F., Riva, S. y Danieli, B., 2006. Laccase-mediated oxidation of natural glycosides. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 39: 3-8.
- Barker, R. y Walker, T.E., 1980.  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of isotopically enriched carbohydrates. En "*Methods in Carbohydrate Chemistry VIII*" (Whistler, K. y Miller, B. eds), Academic Press, London, pp. 151-165.
- Bedford, M.R.P.C.C., 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. En "*Enzymes in Farm Animal Nutrition*" (CAB International, W. ed.), UK, pp. 11-60.
- Behrendt, C.J., Blanchette, R.A. y Farrell, R., 1995. Biological control for wood products and debarking. Patente (European) EP0683023.
- Bekes, F., Gianibelli, M.C. y Wrigley, C., 2004. WHEAT/Grain Proteins and Flour Quality. En "*Encyclopedia of Grain Science*" (Colin, W. ed.), Elsevier, Oxford, pp. 416-423.
- Bidlack, J., Malone, M. y Benson, R., 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 72: 51-56.
- Biely, P., Mislovicová, D. y Toman, R., 1985. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-(1,4)- $\beta$ -xylanases and endo-(1,4)- $\beta$ -glucanases. *Anal. Biochem.* 144: 142-146.
- Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G. y Vicent, T., 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res.* 38: 2166-2172.
- Böckle, B., Martínez, M.J., Guillén, F. y Martínez, A.T., 1999. Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 923-928.
- Boerjan, W., Ralph, J. y Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519-546.

- Bourbonnais, R. y Paice, M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267: 99-102.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Breen, A. y Singleton, F.L., 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 252-258.
- Brooker, D.B., Bakker-Arkema, F.W. y Hall, C.W., 1992. *Drying and Storage of Grains and Oilseeds.*, New York.
- Buranov, A.U. y Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28: 237-259.
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 113-120.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1775-1784.
- Cañas, A., Alcalde, M., Plou, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Camarero, S., 2007. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ. Sci. Technol.* 41: 2964-2971.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, I., Orru, G., Marciallis, M.A. y Cristinzo, G., 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 393-398.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A. y Paz, I.C., 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology* 101: 4754-4766.

- Cardona, C.A. y Sanchez, O.J., 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* 98: 2415-2457.
- Casey, G.P. y Ingledew, W.M., 1986. Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology* 13: 219-280.
- Chan, A.W., Hoffman, R. y McInnis, B., 2004. The Role of Systems Modeling for Sustainable Development Policy Analysis: the Case of Bio-Ethanol. *Ecology and Society* 9.
- Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A. y Kuhad, R.C., 2007. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.* 98: 1947-1950.
- Chu, B.C.H. y Lee, H., 2007. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnol. Adv.* 25: 425-441.
- Claus, H., 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179: 145-150.
- Claus, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93-96.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A. y Dobson, A.D.W., 1996. Oxidation of anthracene and benzo- $\alpha$ -pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4563-4567.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H. y Tang, M.C., 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids* 23: 1527-1534.
- Cui, S. y Wang, Q., 2009. Cell wall polysaccharides in cereals: chemical structures and functional properties. *Structural Chemistry* 20: 291-297.
- Dahlman, O., Jacobs, A. y Sjöberg, J., 2003. Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose* 10: 325-334.

- Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. y Gaillardin, C., 2000. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *Journal of Molecular Biology* 301: 1041-1057.
- Díaz, R., Saparrat, M.C.N., Jurado, M., García-Romera, I., Ocampo, J.A. y Martínez, M.J., 2010. Biochemical and molecular characterization of *Coriolopsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88: 133-142.
- Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H.B., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J. y Kanost, M.R., 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 29-41.
- Dubois, M., Guilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Duff, S.J.B., Cooper, D.G. y Fuller, O.M., 1986. Evaluation of the hydrolytic potential of a crude cellulase from mixed cultivation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis*. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 305-308.
- Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T. y Ueda, K., 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* 133: 671-677.
- Fatih Demirbas, M., 2009. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied Energy* 86: S151-S161.
- Fengel, D. y Wegener, G., 1984. *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*, De Gruyter, Berlin.

- Fontaine, T., Fournet, B. y Karamanos, Y., 1994. A new procedure for the reduction of uronic acid containing polysaccharides. *Journal of Microbiological Methods* 20: 149-157.
- Franceschin, G., Zamboni, A., Bezzo, F. y Bertucco, A., 2008. Ethanol from corn: a technical and economical assessment based on different scenarios. *Chemical Engineering Research and Design* 86: 488-498.
- Fraser, J.R. y Holmes, D.C., 1959. Proximate analysis of wheat flour carbohydrates. IV. Analysis of whole meal flour and some of its fractions. *J. Sci. Food Agric.* 10: 506-512.
- Fujita, M. y Harada, H., 1991. Ultrastructure and formation of wood cell wall. En "Wood and cellulosic chemistry" (David N.-S.Hon y Nobuo Shirashi eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 3-57.
- Galbe, M., Liden, G. y Zacchi, G., 2005. Production of ethanol from biomass - Research in Sweden. *J. Sci. Ind. Res. India* 64: 905-919.
- Galbe, M. y Zacchi, G., 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production.
- Gamble, G.R., Snook, M.E., Henriksson, G. y Akin, D.E., 2000. Phenolic constituents in flax bast tissue and inhibition of cellulase and pectinase. *Biotechnol. Lett.* 22: 741-746.
- García Camús, J.M. y García Laborda, J.A., 2006. Informe de Vigilancia Tecnológica de la Comunidad de Madrid nº 4: Biocarburantes líquidos: Biodiésel y Bioetanol. Fundación para el conocimiento madri+d CEIM.
- García, O., Camarero, S., Colom, J., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Monje, R. y Vidal, T., 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57: 513-519.
- Geigy, J.R., 1965. *Tablas Científicas-Documenta Geigy*, 1965, Basilea, Suiza.

- Gierer, J. y Norén, I., 1980. On the course of delignification during Kraft pulping. *Holzforschung* 34: 197-200.
- Gómez, L.D., Steele-King, C.G. y McQueen-Mason, S.J., 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytol.* 178: 473-485.
- Gray, K.A., Zhao, L.S. y Emptage, M., 2006. Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 141-146.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 2001. The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends Biotechnol.* 19: 340-348.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G. y Zacchi, G., 2006. Bioethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24: 549-556.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. y Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 937-953.
- Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G. y Faaij, A.P.C., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass Bioenerg.* 28: 384-410.
- Hao, O.J., Kim, H. y Chiang, P.C., 2000. Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.*
- Hari Krishna, S., Janardhan Reddy, T. y Chowdary, G.V., 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology* 77: 193-196.
- Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. y Schulein, M., 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nat Biotech* 3: 722-726.

- Higuchi, T., 1985. Lignin biosynthesis. En "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components" (Higuchi, T. ed.), Academic Press, Orlando, pp. 114-160.
- Higuchi, T., 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23-63.
- Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. y Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315: 804-807.
- Hongqiang, L. y Hongzhang, C., 2008. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry* 43: 1447-1451.
- Huang, H.J., Ramaswamy, S., Tschirner, U.W. y Ramarao, B.V., 2008. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology* 62: 1-21.
- Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 2006. Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine free bleaching eucalypt kraft pulp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1159-1165.
- Izydorczyk, M.S. y Biliaderis, C.G., 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 28: 33-48.
- Janaun, J. y Ellis, N., 2010. Perspectives on biodiésel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 1312-1320.
- Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M.J., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2004. Laccase from *Pycnoporus coccineus*: Its role in degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. Abs. Oxizymes, Naples, 3-5 June.
- Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M.J., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of



- aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 478-486.
- Jáuregui, J., Valderrama, B., Albores, A. y Vázquez-Duhalt, R., 2003. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation* 14: 397-406.
- Jeon, J.R., Kim, E.J., Murugesan, K., Park, H.K., Kim, Y.M., Kwon, J.H., Kim, W.G., Lee, J.Y. y Chang, Y.S., 2010. Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. *Microbial Biotechnology* 3: 324-335.
- Johannes, C. y Majcherczyk, A., 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 524-528.
- Johannes, C., Majcherczyk, A. y Hüttermann, A., 1996. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 313-317.
- Jönsson, L.J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.O. y Hahn-Hägerdal, B., 1998. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 691-697.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M. y Viikari, L., 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* 40: 3519-3525.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, M.A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresource Technol.* 100: 6378-6384.
- Kabel, M.A., Bos, G., Zeevalkin, J., Voragen, A.G.J. y Schols, H.A., 2007a. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and

- enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 98: 2032-2034.
- Kamm, B. y Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 137-145.
- Kang, K.H., Dec, J., Park, H. y Bollag, J.M., 2002. Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Res.* 36: 4907-4915.
- Kim, S. y Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg.* 26: 361-375.
- Kirk, T.K. y Farrell, R.L., 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Ko, E.M., Leem, Y.E. y Choi, H.T., 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 98-102.
- Kumar, R. y Wyman, C.E., 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 100: 4203-4213.
- Kunamneni, A., Camarero, S., Garcia-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M., 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb. Cell Fact.* 7: 32.
- Laine, R.A., Esselman, W.J. y Sweeley, C.C., 1972. Gas-Liquid chromatography of carbohydrates. *Methods Enzymol.* 28: 159-167.
- Lam, T.B.T., Kadoya, K. y Iiyama, K., 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the  $\beta$ -position, in grass cell walls. *Phytochemistry* 57: 987-992.
- Lamarino, G., Rao, M.A. y Gianfreda, L., 2009. Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. *Chemosphere* 74: 216-223.

- Lapierre, C., Jouin, D. y Monties, B., 1989. Lignin characterization of wheat straw samples as determined by chemical degradation procedures. En "Physico-Chemical Characterization of Plant Residues for Industrial and Feed Use" (Chesson, A. y Orskov, E.R. eds), Elsevier Appl.Sci., Amsterdam, pp. 118-130.
- Lazaridou, A., Chornick, T., Biliaderis, C.G. y Izydorczyk, M.S., 2008. Composition and molecular structure of polysaccharides released from barley endosperm cell walls by sequential extraction with water, malt enzymes, and alkali. *Journal of Cereal Science* 48: 304-318.
- Lechón, Y., Cabal, H., de la Rúa, C., Caldés, N., Santamaría, M. y Sáez, R., 2006. Energy and greenhouse gas emission savings of biofuels in Spain's transport fuel. The adoption of the EU policy on biofuels. *Biomass and Bioenergy* 33: 920-932.
- Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56: 1-24.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtás-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. y Rogalski, J., 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microb.* 41: 185-227.
- Li, W., Cui, S.W. y Kakuda, Y., 2006. Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat  $\beta$ -D-glucans. *Carbohydrate Polymers* 63: 408-416.
- Lin, Y. y Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 627-642.
- Litthauer, D., van Vuuren, M.J., van Tonder, A. y Wolfaardt, F.W., 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme Microb. Technol.* 40: 563-568.

- Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E. y Laser, M., 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 577-583.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. y Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 506.
- Lyons, T.P., Kelsall, D.R. y Jacques, K.A., 2003. *The Alcohol textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries.*, Nottingham University Press, Nottingham.
- Mai, C., Schormann, W., Huttermann, A., Kappl, R. y Huttermann, J., 2002. The influence of laccase on the chemo-enzymatic synthesis of lignin graft-copolymers. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 66-72.
- Martin, C., Almazan, O., Marcet, M. y Jonsson, L.J., 2007. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. *Int. Sugar J.* 109: 33-39.
- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C. y Gutiérrez, A., 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 348-357.
- Martínez, M.J., Muñoz, C., Guillén, F. y Martínez, A.T., 1994. Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 500-504.
- Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F. y Martínez, A.T., 1996. Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237: 424-432.
- Martínez-Anaya, M.A. y Jiménez, T., 2001. Amylases and hemicellulases in breadmaking. Degradation by-products and potential relationship with functionality. *Food science and technology international* 7: 5-14.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H. y Henriques, A.O., 2002. Molecular and biochemical

- characterization of a highly stable bacterial laccase which occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277: 18849-18859.
- Marzorati, M., Danieli, B., Haltrich, D. y Riva, S., 2005. Selective laccase-mediated oxidation of sugars derivatives. *Green Chem.* 7: 310-315.
- Mathlouthi, M. y Koenig, J.L., 1987. *Vibrational Spectra of Carbohydrates*. En "Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry" (Derek Horton, R.S.T.a. ed.), Academic Press, pp. 7-89.
- Mayer, A.M. y Staples, R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- McKendry, P., 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology* 83: 37-46.
- Messerschmidt, A. y Huber, A., 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* 187: 341-352.
- Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T.L. y Wieghardt, K., 2001. *Handbook of metalloproteins*, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester.
- Messner, R. y Kubicek, C.P., 1990. Evidence for a single, specific  $\beta$ -glucosidase in cell walls from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme and Microbial Technology* 12: 685-690.
- Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G.M. y Duran, N., 2007. Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 45: 102-107.
- Mojovic, L., Nikolic, S., Rakin, M. y Vukasinovic, M., 2006. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel* 85: 1750-1755.
- Morozova, V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V. y Yaropolov, A.I., 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry-Moscow* 72: 1136-1150.

- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. y Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 96: 673-686.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and  $Mn^{2+}$  oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2166-2174.
- Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimares, P.M.R., Silva, J.P., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., Vicente, A., Domingues, L. y Teixeira, J.A., 2011. Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. *Biotechnology Advances* 28: 817-830.
- Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K. y Sato, T., 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology Sgm.* 149:2455-2462: 2455-2462.
- Needs, P.W. y Selvendran, R.R., 1993. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydr. Res.* 245: 1-10.
- Nigam, P. y Singh, D., 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 770-778.
- Nikolic, S., Mojovic, L., Rakin, M. y Pejin, D., 2009. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel*.
- Oscarsson, M., Andersson, R., Salomonsson, A.-C. y Aman, P., 1996. Chemical Composition of Barley Samples Focusing on Dietary Fibre Components. *Journal of Cereal Science* 24: 161-170.

- Palmqvist, E., Meinander, Q., Grage, H. y Hahn-Hägerdal, B., 1999. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 46-55.
- Palonen, H. y Viikari, L., 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 550-557.
- Paszczynski, A., Crawford, R.L. y Huynh, V.-B., 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Purification. *Methods Enzymol.* 161: 264-270.
- Pejin, D., Mojovic, L.J., Vucurovic, V., Pejin, J., Dencic, S. y Rakin, M., 2009. Fermentation of wheat and triticale hydrolysates: A comparative study. *Fuel* 88: 1625-1628.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. y Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 577-591.
- Primo, E.Y., 1982. *Química Agrícola III. Alimentos*, Editorial Alhambra, Madrid.
- Rakopoulos, C.D., akaras, E.C. y Giakoumis, E.G., 2008. Effects of ethanol-diésel fuel blends on the performance and exhaust emissions of heavy duty DI diésel engine. *Energy Conversion and Management* 49: 3155-3162.
- Reilly P.J., 1981. Xylanases: structure and function. *Basic Life Sci.* 18: 111-129.
- Rhodes, A. y Fletcher, D., 1996. *Principles of Industrial Microbiology*. (Pergamon Press ed.), New York.
- Robert, P., Marquis, M., Barron, C., Guillon, F. y Saulnier, L., 2005. FT-IR Investigation of Cell Wall Polysaccharides from Cereal Grains. *Arabinoxylan Infrared Assignment. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7014-7018.

- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol. Biochem.* 36: 909-916.
- Rogers, P.L., Jeon, Y.J. y Svenson, C.J., 2005. Application of biotechnology to industrial sustainability. *Process Saf. Environ. Prot.* 83: 499-503.
- Romero, E., Bautista, J., Garcia-Martínez, A.M., Cremades, O. y Parrado, J., 2007. Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones. *Process Biochemistry* 42: 1492-1497.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A. y Wu, Y.V., 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnol. Prog.* 21: 816-822.
- Sánchez, O.J. y Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99: 5270-5295.
- Saparrat, M., Jurado, M., Díaz, R. y Martínez, M.J., 2009. Regulation of expression of CRL1 laccase gene from *Coriolopsis rigida* during detoxification of 'alpeorujo'. *New Biotechnology* 25: S82.
- Saparrat, M.C.N., Guillén, F., Arambarri, A.M., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white-rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1534-1540.
- Saparrat, M.C.N., Jurado, M., Díaz, R., García-Romera, I. y Martínez, M.J., 2010. Transformation of the water soluble fraction from "alpeorujo" by *Coriolopsis rigida*: The role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. *Chemosphere* 78: 72-76.



- Schwietzke, S., Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N. y Ladisch, M., 2009. *Ethanol Production from Maize*. En "Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement" (Kriz, A.L. y Larkins, B.A. eds), Springer Berlin Heidelberg, pp. 347-364.
- Servili, M., de Stefano, G., Piacquadio, P. y Sciancalepore, V., 2000. A novel method for removing phenols from grape must. *Am. J. Enol. Viticult.* 51: 357-361.
- Singleton, V. y Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
- Solomon, B.D., Barnes, J.R. y Halvorsen, K.E., 2007. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy* 31: 416-425.
- Somogyi, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160: 61-73.
- Spector, M.P., 2009. Metabolism, Central (Intermediary). En "Encyclopedia of Microbiology" (Moselio, S. ed.), Academic Press, Oxford, pp. 242-264.
- Sun, R.C., Sun, X.F., Wang, S.Q., Zhu, W. y Wang, X.Y., 2002. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Ind. Crops Prod.* 15: 179-188.
- Sun, R.C. y Tomkinson, J., 2003. Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pre-treated wheat straw. *European Polymer Journal* 39: 751-759.
- Sun, Y. y Cheng, J.Y., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83: 1-11.
- Tabka, M.G., Herpoël-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M. y Sigoillot, J.C., 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol

*production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. Enzyme and Microbial Technology 39: 897-902.*

Taniguchi, H. y Honnda, Y., 2009. Amylases. En "Encyclopedia of Microbiology" (Moselio, S. ed.), Academic Press, Oxford, pp. 159-173.

Tetsch, L., Bend, J. y Holker, U., 2006. Molecular and enzymatic characterisation of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 90: 183-194.

Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140: 19-26.

Togrul, H. y Arslan, N., 2003. Production of carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose and rheological behaviour of carboxymethyl cellulose. Carbohydrate Polymers 54: 73-82.

Tomás-Pejó, E. Tesis Doctoral: Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas de proceso. 2010. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología III.

Torija, M.J., Rozés, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. y Mas, A., 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology 80: 47-53.

Uyama, H. y Kobayashi, S., 2006. Enzymatic synthesis and properties of polymers from polyphenols. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers 194: 51-67.

Van Vleet, J.H. y Jeffries, T.W., 2009. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. Curr. Opin. Biotechnol. 20: 300-306.

- Wahlbom, F., Hanh-hägerdal, B., and Jönsson, L. *Saccharomyces cerevisiae* mutant.. 2008. Patente (United States).
- Ward, O.P., Rao, M.B. y Kulkarni, A., 2009. Proteases, Production. En "Encyclopedia of Microbiology" (Moselio, S. ed.), Academic Press, Oxford, pp. 495-511.
- Watanabe, K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 237-241.
- Wilson, D.B., 2009. Cellulases. En "Encyclopedia of Microbiology" (Moselio, S. ed.), Academic Press, Oxford, pp. 252-258.
- Wong, Y.X. y Yu, J., 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 33: 3512-3520.
- Wood, T.M. y Bhat, K.M., 1988. Methods for measuring cellulase activities. En "Methods in EnzymologyBiomass Part A: Cellulose and Hemicellulose" (Willis, A.W. ed.), Academic Press, pp. 87-112.
- Wrigley, C., 2004. CEREALS/Overview. En "Encyclopedia of Grain Science" (Colin, W. ed.), Elsevier, Oxford, pp. 187-201.
- Xie, X., Cui, S.W., Li, W. y Tsao, R., 2008. Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Research International* 41: 882-887.
- Xu, W., Reddy, N. y Yang, Y., 2009. Extraction, characterization and potential applications of cellulose in corn kernels and Distillers' dried grains with solubles (DDGS). *Carbohydrate Polymers* 76: 521-527.
- Yang, B. y Wyman, C.E., 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 88-98.
- Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. y Varfolomeyev, S.D., 1994. Laccase-Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49: 257-280.
- Yoshitake, A., Katayama, Y., Nakamura, M., Iimura, Y., Kawai, S. y Morohoshi, N., 1993. N-linked carbohydrate chains protect laccase-III

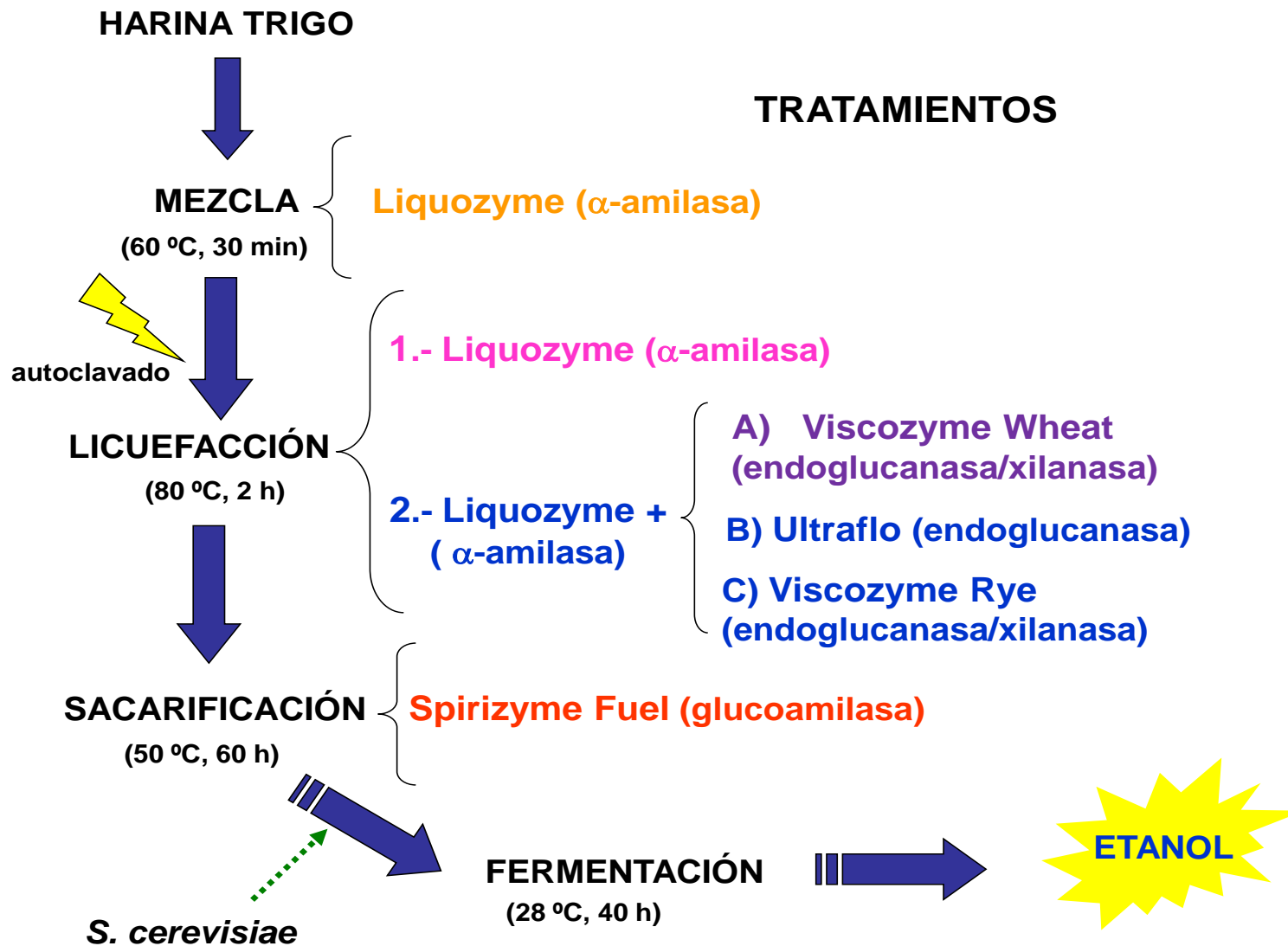
*from proteolysis in Coriolus versicolor. J. Gen. Microbiol. 139: 179-185.*

Zhang, L.h., Li, D., Wang, L.j., Wang, T.p., Zhang, L., Chen, X.D. y Mao, Z.h., 2008. *Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. Bioresource Technology 99: 8512-8515.*

Zhu, X. y Williamson, P.R., 2004. *Role of laccase in the biology and virulence of Cryptococcus neoformans. FEMS Yeast Research 5: 1-10.*

Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2006. *Laccase purification and characterization from Trametes trogii isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. Enzyme Microb. Technol. 39: 141-148.*





**Fig. 2.4.** Esquema del proceso realizado en el laboratorio, siguiendo las etapas del proceso comercial e indicando los diferentes cócteles utilizados en cada caso para tratar de optimizar la producción de bioetanol.

**Tabla 3.1.** Actividades enzimáticas presentes en los cócteles comerciales estudiados.

COMPLEJOS COMERCIALES			ACTIVIDADES DETECTADAS							
Nombre comercial	Actividad descrita	Proteínas (mg/mL)	$\alpha$ -Amilasa		Glucoamilasa		Proteasa		$\beta$ -(1,3)-Glucanasa	
			U/mL	U/mg	mU/mL	mU/mg	U	U/mg	U/mL	U/mg
1 Alcalase 2,5 L	Proteasa	42	-	-	-	-	882,4	21,0	-	-
2 Liquozyme SC DS	$\alpha$ -Amilasa	23	7905,4	343,7	-	-	8,1	0,4	217,8	9,5
3 Spirizyme Fuel	Glucoamilasa	130	21687,8	166,8	21907,9	168,5	-	-	480,4	3,7
4 Viscozyme Barley	Amilasa / Celulasa	35	415,3	11,9	-	-	-	-	180,4	5,2
5 Viscozyme Wheat	Xilanasa / Endoglucanasa	31	-	-	26,3	0,8	-	-	-	-
6 Ultraflo L	Endoglucanasa	7	-	-	-	-	3,3	0,5	61,7	8,8
7 Viscozyme Rye	Xilanasa / Endoglucanasa	19	394,2	20,7	-	-	-	-	206,0	10,8
8 Celluclast 1,5 L FG	Celulasa	81	-	-	-	-	-	-	82,6	1,0
9 Novozym 50010	$\beta$ -Glucosidasa	68	4608,2	67,8	5223,7	76,8	-	-	148,9	2,2
10 NS-50012	KIT BIOMASA	36	1055,8	29,3	492,1	13,7	6,8	0,2	416,8	11,6
11 NS-50013		81	-	-	-	-	-	-	37,5	0,5
12 NS-50030		17	-	-	-	-	-	-	-	-
13 NS-22002		20	-	-	-	-	-	-	39,9	2,0
14 Novozym 50070	$\beta$ -(1,3)-Glucanasa	35	1147,1	32,8	-	-	-	-	715,2	20,4
15 Accellerase 1000	$\beta$ -Glucosidasa / Endoglucanasa	43	63,7	1,5	62368,4	1450,4	1,1	-	225,0	5,2

Nombre comercial	Actividad descrita	Proteínas (mg/mL)	$\beta$ -Xilosidasa		Xilanasa		$\beta$ -Glucosidasa		Endoglucanasa		Avicelasa	
			mU/mL	mU/mg	U/mL	U/mg	mU/mL	mU/mg	U/mL	U/mg	U/mL	U/mg
1 Alcalase 2,5 L	Proteasa	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 Liquozyme SC DS	$\alpha$ -Amilasa	23	-	-	188,4	8,2	-	-	191,8	8,3	321,4	14,0
3 Spirizyme Fuel	Glucoamilasa	130	157,9	1,2	300,5	2,3	100,0	0,8	157,2	1,2	362,9	2,8
4 Viscozyme Barley	Amilasa / Celulasa	35	15263,2	436,1	1228,5	35,1	473,7	13,5	317,4	9,1	321,4	9,2
5 Viscozyme Wheat	Xilanasa / Endoglucanasa	31	21052,6	679,1	2006,0	64,7	5473,7	176,6	517,8	16,7	133,1	4,3
6 Ultraflo L	Endoglucanasa	7	2631,6	375,9	428,3	61,2	7631,6	1090,2	157,9	22,6	89,4	12,8
7 Viscozyme Rye	Xilanasa / Endoglucanasa	19	12631,6	664,8	1168,2	61,5	6065,8	319,3	655,8	34,5	453,3	23,9
8 Celluclast 1,5 L FG	Celulasa	81	11578,9	142,9	285,6	3,5	10894,7	134,5	915,0	11,3	357,6	4,4
9 Novozym 50010	$\beta$ -Glucosidasa	68	775,0	11,4	56,5	0,8	88026,3	1294,5	134,6	2,0	40,9	0,6
10 NS-50012	KIT BIOMASA	36	868,4	24,1	568,4	15,8	12894,7	358,2	3505,1	97,4	500,8	13,9
11 NS-50013		81	13473,7	166,3	459,0	5,7	9473,7	117,0	4239,0	52,3	503,8	6,2
12 NS-50030		17	5631,6	331,3	924,1	54,4	171,1	10,1	1888,2	111,1	8,8	0,5
13 NS-22002		20	4000,0	200,0	450,0	22,5	9868,4	493,4	1466,2	73,3	13,0	0,7
14 Novozym 50070	$\beta$ -(1,3)-Glucanasa	35	-	-	827,6	23,6	1552,6	44,4	14062,7	401,8	1074,4	30,7
15 Accellerase 1000	$\beta$ -Glucosidasa / Endoglucanasa	43	986,8	22,9	370,5	8,6	62368,4	1450,4	2038,9	47,4	348,6	8,1